THESE

présentée

à

L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

Pour obtenir le grade de

Docteur ès Sciences Naturelles

par

Hervé THIELLEMENT

ANALYSE GENETIQUE D'UN PHENOMENE A DETERMINISME NON-MENDELIEN CHEZ VICIA FABA L. : LA STERILITE MÂLE

Soutenue le 30 Mars 1981

Devant la Commission d'Examen :

MM.	Y. DEMARLY	Président
	J.C. MOUNOLOU	Rapporteur
Mme	J. BEISSON)	
MM.	M. RIVES)	Examinateurs
	Ph. VIGIER)	

n° 2410

THESE

présentée

à

L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

Pour obtenir le grade de

Docteur ès Sciences Naturelles

par

Hervé THIELLEMENT

ANALYSE GENETIQUE D'UN PHENOMENE A DETERMINISME NON-MENDELIEN CHEZ VICIA FABA L. : LA STERILITE MÂLE

Soutenue le 30 Mars 1981

Devant la Commission d'Examen :

MM.	Y. DEMARLY	Président
	J.C. MOUNOLOU	Rapporteur
Mme	J. BEISSON)	
MM.	M. RIVES)	Examinateurs
	Ph. VIGIER)	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A la mémoire de mes parents

°°°

"Ceux qui savent me devinent, et pour ceux qui ne peuvent ou ne veulent pas me comprendre, j'amoncellerais sans fruit les explications".

Charles BAUDELAIRE

(Projet de Préface pour une édition nouvelle des Fleurs du Mal).

°°°

"Cette immodération, cette désobéissance, cette révolte de l'esprit humain contre toute limite imposée, soit au nom du Bon Dieu, soit au nom de la science, constituent son honneur, le secret de sa puissance et de sa liberté. C'est en cherchant l'impossible que l'homme a toujours réalisé et reconnu le possible et ceux qui se sont sagement limités à ce qui leur paraissait possible n'ont jamais avancé d'un seul pas."

Michel BAKOUNINE

("Considérations sur le Fantôme divin, sur le Monde réel et sur l'Homme").

°°°

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Amélioration des Plantes d'Orsay. Monsieur DEMARLY qui le dirige m'a appris ce que je sais de la génétique végétale. Il m'a permis de travailler en toute liberté. Qu'il soit remercié ici pour son attitude et ses conseils.

Depuis le commencement de ces recherches, Jean-Claude MOUNOLOU a toujours suivi et discuté avec intérêt mes résultats et ma démarche. Je le remercie vivement pour sa disponibilité, pour la confiance qu'il m'a accordée et pour avoir accepté la tâche ingrate de rapporteur.

Madame BEISSON s'est intéressée à ce travail et je la remercie pour ses conseils et ses avis.

Par mon appartenance à l'I.N.R.A. j'ai eu souvent l'occasion de discuter des aspects théoriques et pratiques de ces expériences avec Max RIVES. Qu'il soit remercié ici pour ses critiques constructives et pour avoir accepté de participer à ce jury.

Monsieur VIGIER était parmi ceux qui m'ont fait aimer la génétique au début de mes études universitaires. Je suis heureux qu'il ait accepté de s'intéresser à mon travail et de le juger.

Je remercie aussi tous ceux qui m'ont aidé aux temps forts de ces expériences et notamment lors des nombreuses et parfois fastidieuses notations : Madina FERAULT, Joël BLAISONNEAU, Marie-Pierre DIGARD et Michel ZIVY.

Merci à Madame DEFOUG d'avoir su transformer mes brouillons en véritables figures.

Je remercie Jean-Paul HOFMANN et Dominique de VIENNE pour leur amitié et les discussions quotidiennes dans lesquels ce travail a pu se conclure.

Enfin ces recherches ont bénéficié de l'aide financière de l'A.C.V.F., puis de l'A.M.S.O.L. Protéagineux. Que Monsieur PICARD qui m'a appris la Fèverole et grâce à qui ces soutiens ont été obtenus soit sincèrement remercié.

"ANALYSE GENETIQUE D'UN PHENOMENE A DETERMINISME NON-MENDELIEN CHEZ *VICIA FABA* L. : LA STERILITE MALE"

	Pages
I - INTRODUCTION	6
A. La stérilité mâle	8
1) Définitions	8
2) Les phénotypes et leurs variations	9
3) Les interprétations génétiques	11
- L' "hypothèse virale"	12
- L' "hypothèse mitochondriale"	13
- Conclusions	16
B. La stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* L. Historique et hypothèses....	18
C. La Plante	25
D. Méthodologie	28
Bibliographie de l'introduction	30
II - EXPERIMENTATION : Résultats et Interprétations	37
A. Hétérogénéité phénotypique d'une lignée mâle stérile	38
B. Hérédité des phénotypes polliniques	45
C. Sur la réversion somatique de la stérilité mâle nucléo-cytoplasmique	53
D. Sur quelques descendances de plantes présentant simultanément deux phénotypes polliniques à déterminisme non-mendélien	58
E. A grand mother effect	62
F. Intermediate phenotypes	71
G. Genetical arguments for cytoplasmic heterogeneity	81

III - DISCUSSION GENERALE 108

A. Synthèse de l'expérimentation 109

B. De l' "hypothèse mitochondriale" 112

1) Tendance à l'homogénéité et origine de l'hétérogénéîté (Levure, *Podospora*,Paramécie) 112

2) Rôle du noyau sur l'évolution d'un cytoplasme mixte (cellules hybrides Homme-Souris)..... 112

3) Recombinaison et hétérogénéîté moléculaire chez les Végétaux Supérieurs (Tabac, Maîs) . 116

4) Stabilité et hétérogénéîté (cytoplasme T du Maîs) 118

5) Origine moléculaire de l'hétérogénéité (cytoplasme S du Maîs) 120

6) Conclusions pour *Vicia faba*..... 122

7) Problème de l'hétérogénéité latente 124

C. De l' "hypothèse virale" 125

D. Conclusions 129

1) Sur la nature des déterminants 129

2) Sur quelques perspectives en amélioration des plantes 130

3) Sur la méthodologie 131

Bibliographie de la Discussion 132

RESUME 137

I - INTRODUCTION

La stérilité mâle cytoplasmique, phénomène répandu chez les Angiospermes, présente un intérêt à la fois économique et fondamental. Il permet en sélection végétale de contrôler les croisements et d'exploiter l'hétérosis.

Le déterminisme génétique de la stérilité mâle cytoplasmique est complexe. Le phénotype mâle-stérile résulte d'intéractions entre facteurs nucléaires, facteurs cytoplasmiques et facteurs "externes" ou "de nature physiologique". Conditionnant le système de reproduction, la stérilité mâle joue un rôle majeur dans la structure génétique des populations et de leur évolution.

Nous avons choisi d'aborder par une méthodologie génétique l'étude de la stérilité mâle cytoplasmique chez la Fève ou Fèverole, *Vicia faba* L. . Les particularités de sa manifestation limitent le potentiel agronomique de cette espèce riche en protéines, cultivée dans le monde entier.

La démarche expérimentale a été de définir les modalités d'expression du phénotype au niveau de la fleur et de la plante et de s'intéresser à son déterminisme héréditaire, quand les conditions nucléaires sont fixées.

Les expériences rapportées dans ce mémoire et leurs intéprétations seront discutées et replacées dans le cadre de la génétique des interactions nucléo-cytoplasmiques.

A - LA STERILITE MALE

1) Définitions

Une plante mâle-stérile n'aura aucune descendance en tant que parent mâle. Elle se comportera uniquement comme femelle. Ce caractère, très répandu chez les Angiospermes, est particulièrement intéressant pour la sélection puisqu'il permet de transformer les espèces hermaphrodites ou monoïques en dioïques. Cela rend alors possible le contrôle des croisements sans castration, la fécondation croisée chez les espèces autogames ou autocompatibles et l'accroissement du brassage génétique dans les variétés synthétiques.

On peut distinguer deux types de stérilité mâle sur la base de leur déterminisme héréditaire : un type "génique" sous le contrôle de facteurs chromosomiques nucléaires et un type "cytoplasmique" sous la dépendance de facteurs nucléaires et cytoplasmiques.

La stérilité mâle "génique" apparait contrôlée en général par un déterminisme simple mono ou bifactoriel. Les allèles responsables sont presque toujours récessifs.

La stérilité mâle "cytoplasmique" présente un déterminisme plus complexe où interviennent un "état cytoplasmique" dit stérile et des facteurs nucléaires. Elle peut se trouver à l'état spontanné dans la nature (Maïs, Betterave, Oignon, Piment, Fève, Sorgho, Thym, Origan...) ou apparaître à la suite de croisements interspécifiques (Blé, Coton, Tournesol, Tabac, Pomme de Terre, Seigle, Pétunia, Riz...).

Quand on croise un mâle-stérile cytoplasmique par un mâle-fertile la descendance peut être homogène mâle-stérile, dans ce cas le parent mâle est dit "mainteneur" (de stérilité). La descendance peut être aussi entièrement ou partiellement mâle-fertile, dans ce cas le parent mâle est dit "restaurateur" (de fertilité). Cette restauration nucléaire est généralement mono ou digénique comme chez le Maïs (BECKETT, 1971) ou la Fève (BOND *et al.*, 1966), plus rarement oligogénique comme chez le Blé (revue par AURIAU *et al.*, 1973).

La classification entre les deux types - génique et cytoplasmique - est parfois erronée. Chez le Colza (ROUSSELLE, communication personnelle) le génotype mainteneur était jusqu'alors absent des populations étudiées. Ainsi appelait-on normale, fertile, une lignée mâle-stérile cytoplasmique restaurée, et mâle-stériles géniques des mutants de gène(s) de restauration. Chez le Maïs (BURNAHM, 1978) on peut rechercher des cytoplasmes permettant l'expression normale de la gamètogenèse mâle en présence de gènes nucléaires de stérilité.

En fait, la gamétogenèse mâle est une chaîne de mécanismes physiologiques complexes. Des perturbations peuvent intervenir à bien des niveaux. L'information nécessaire à sa réalisation est partagée entre facteurs nucléaires et cytoplasmiques. L'expression - le phénotype - dépend de leur interaction et du milieu.

2) Les Phénotypes et leurs variations

Les variations d'expression du phénotype mâle-stérile sont nombreuses. On peut trouver des phénocopies, c'est-à-dire que la stérilité mâle peut être induite chez une plante mâle fertile par des conditions de milieu.

C'est le cas du Blé sur sol carencé en cuivre (GRAHAM, 1975) ou de l'Oignon dans des conditions environnementales données (OCKENDON & GATES, 1976). Le phénotype varie également quand la plante est génétiquement mâle-stérile. Ainsi la température ou l'intensité lumineuse influe sur l'expression du phénotype mâle-stérile cytoplasmique par exemple chez l'Oignon (VAN DER MEER & VAN BENNEKON, 1978), le Pétunia (VAN MARREWIJK, 1969 ; SINGH, 1975) ou la Fèverole (DUC, 1978). L'ensemble de ces variations dicte la plus grande prudence lors des observations et de l'analyse des résultats.

Les études anatomiques et cytologiques des mâles stériles cytoplasmiques (LASER & LERNSTEN, 1972) ont montré que, selon les espèces, la gamétogenèse mâle peut être interrompue à différents moments, depuis la cellule sporogène jusqu'au grain de pollen mûr. Il convient de distinguer le stade où l'observateur perçoit la perturbation et celui où elle s'est effectivement produite, qui peut être antérieur. Dans certains cas (Tabac, Coton) c'est l'ensemble de la morphologie florale qui est profondément perturbé. Dans une même espèce différents cytoplasmes (que l'on distingue d'habitude par les systèmes de restauration) peuvent conduire à différents phénotypes de stérilité mâle : c'est le cas chez *Solanum* (GRUN *& al.*, 1962) chez le Mil (BARBIER, 1978), chez le Coton (MEYER, 1969) entre autres. Un même cytoplasme peut induire différents types d'avortement du pollen selon le contexte nucléaire, gènes de restauration exclus, comme chez le Pétunia (IZHAR & FRANKEL, 1976 ; IZHAR, 1977) ou la Féverole (DUC, 1978).

Au sein d'une même lignée mâle-stérile de Maïs à cytoplasme C, LEE *& al* (1979) ont montré que deux types physiologiques différents d'avortement pollinique peuvent coexister. Dans le cadre de ce mémoire on trouvera au moins trois types distincts de phénotypes floraux, résultant vraisemblablement de moments différents d'avortement de la gamètogenèse mâle, et ce au sein d'une lignée mâle stérile cytoplasmique fixée, et au sein d'une même plante.

Il apparait donc difficile d'aborder la stérilité mâle comme la résultante d'un mécanisme physiologique unique et commun à tous les Angiospermes, et de là en déduire ou en supposer un déterminisme génétique uniforme.

3) Les Interprétations génétiques

Quels sont, *a priori*, les véhicules possibles d'une hérédité cytoplasmique ? PREER (1971) propose de distinguer trois catégories :

1) les cas qui impliquent la régulation de gènes nucléaires, c'est-à-dire l' "hérédité de régime" ou "l'état chromosomique du gamète femelle" (L'HERITIER, 1975).

2) Les cas où des structures cellulaires préexistantes dirigent la formation de nouvelles structures : l'hérédité "de membrane" (étudié particulièrement sur le cortex des Ciliés : BEISSON & SONNEBORN, 1965 ; NANNEY, 1968).

3) Les cas dans lesquels un acide nucléique cytoplasmique est impliqué, lorsqu'il s'agit de virus, plasmides bactériens, symbiontes intracellulaires, mitochondries ou chloroplastes.

Les auteurs qui se sont intéressés à la stérilité mâle cytoplasmique n'ont pratiquement jamais considéré les deux premières catégories. Ils se groupent en deux écoles : les uns avancent l' "hypothèse virale", les autres l' "hypothèse mitochondriale".

a) L' "hypothèse virale"

Selon ATANASOFF (1964, 1971) la stérilité mâle cytoplasmique serait due à la présence d'un virus. Parce que certains virus se transmettent par greffe, de nombreuses expériences ont été faites pour savoir si la stérilité mâle était également transmissible. DEMARLY (1977) rapporte que sur 27 expériences publiées, 8 ont été positives et une seule répétable. Il s'agit des travaux de FRANKEL (1956, 1962) sur Pétunia, repris par EDWARDSON & CORBETT (1961). C'est dans la descendance du greffon resté fertile sur porte-greffe mâle-stérile que quelques plantes mâles-stériles ont été trouvées. Le même résultat a été obtenu récemment sur la Luzerne (THOMPSON & AXTELL, 1978). Chez la Betterave où les expériences de greffe avaient parfois réussi (CURTIS, 1967), LICHTER (1977) obtient des plantes mâles-fertiles après culture in vitro de méristèmes et thermothérapie de plantes males-stériles. Ces deux techniques sont couramment utilisées pour éliminer les virus. Il faut rappeler que la plupart des espèces végétales contiennent des virus et/ou des viroïdes dont le caractère infectieux n'est pas toujours manifeste.

La recherche en microscopie optique ou électronique de particules virales a été réalisée, notamment chez *Vicia Faba*. Ainsi EDWARDSON *et al*. (1976) ont trouvé dans les tissus des plantes mâle-stériles des "cytoplasmic spherical bodies " (C.S.B.) d'apparence virale. Cette

expérience a été réalisée sur un des deux cytoplasmes mâle-stériles trouvés chez la Fève. Sur l'autre cytoplasme on n'a pas pu retrouver ces particules (MARTIN & MEIGNOZ, non publié). Chez cette espèce, les expériences de greffe (BOND *et al.*, 1966 ; DUC 1978) n'ont pas permis de transmettre la stérilité mâle. Il est donc difficile de dire si les C.S.B. sont la cause ou la conséquence d'un état cytoplasmique particulier.

b) L' "hypothèse mitochondriale"

L'autre grande famille d'hypothèse situe la cause de la stérilité mâle cytoplasmique au niveau mitochondrial. Elle fut exprimée pour la première fois par RHOADES (1950) qui travaillait sur le système mutateur "iojap" du Maïs où se manifestaient à la fois des déficiences chlorophylliennes et des stérilités mâles. Isolant un secteur vert mâle-stérile, il attribua la déficience chlorophyllienne à une mutation chloroplastique et la stérilité mâle à une mutation mitochondriale.

Cette hypothèse fut reprise dans les années soixante par certains chercheurs (SARKISSIAN & Mc DANIEL, 1967; SARKISSIAN & SRIVASTAVA, 1967) qui montrent que les fractions enrichies en mitochondries de plantes mâle-stériles cytoplasmiques et mâle-fertile isogéniques peuvent être distinguées par la mesure de paramètres respiratoires. Ces auteurs allaient même jusqu'à proposer une hétérogénéité mitochondriale au sein de différents génotypes de Maïs pour rendre compte de résultats obtenus au niveau de l'hétérosis. Ces résultats concernant la "complémentation mitochondriale", où le mélange *in vitro* des mitochondries parentales mime les performances des mitochondries de l'hybride, n'ont jamais pu être répétés (voir LABIB, 1977 pour revue).

La méthode polarographique d'enregistrement de la consommation d'oxygène (oxygraphe) a permis toutefois de distinguer un lot de Blé mâle-stérile (cytoplasme de *Triticum timopheevi*) d'un lot mâle-fertile isogénique (cytoplasme de *T. aestivum*) (LABIB, 1977). On a pu également avec l'oxygraphe distinguer les fractions enrichies en mitochondries de mâle-stériles et de mâle-fertiles isogéniques par leur sensibilité différentielle à divers poisons : à la toxine de certaines races de champignons chez le Maïs à cytoplasme Texas (MILLER & KOEPPE, 1971 ; BERVILLE & CASSINI, 1974 ; BARATT & FLAVELL, 1975), au cyanure chez le Blé (BERVILLE *et al*, 1974), à la digitonine (GREGORY *et al.*, 1977)et au méthomil KOEPPE *et al.*, 1978) chez le Maïs.

La théorie du support mitochondrial de la stérilité mâle cytoplasmique est alors développée par DEMARLY (BERVILLE & DEMARLY, 1970 ; DEMARLY, 1974, 1977) qui propose l'existence de populations d'organites avec des efficiences respiratoires et des cinétiques de multiplication différentes.

Ces dernières années, de nouvelles approches expérimentales ont apporté d'autres arguments. Les études cytologiques et notamment le comptage des mitochondries lors des gamètogenèses mâle et femelle chez le Maïs (WARMKE & LEE, 1978 ; LEE & WARMKE, 1979) indiquent que le nombre de mitochondries par cellule est multiplié par un facteur 40 dans le tapis et par un facteur 20 dans les cellules sporagènes juste avant la meïose. Les comptages effectués dans le sac embryonnaire et le nucelle, comme dans les autres tissus des organes mâles, ne font rien apparaître de tel. Cette phase de division mitochondriale rapide se situe juste avant la période de désorganisation

interne des mitochondries du tapis observée chez les mâle-stériles cytoplasmiques Texas. Les mitochondries sont alors aussi nombreuses que chez les mâle-fertiles mais leur taille est plus grande, due selon les auteurs au gonflement qui précède la lyse.

L'analyse de la séquence de l'ADN mitochondrial, par électrophorèse des fragments obtenus après digestion par des endonucléases de restriction, a montré la différence de structure qui existe entre les différents cytoplasmes mâle-stériles et fertiles (normaux) de Maïs (LEVINGS & PRING, 1976, 1979). Le même résultat a été observé entre les formes mâle stérile et mâle-fertile de Blé (QUETIER & VEDEL, 1977), alors que l'ADN chloroplastique n'apparait pas différent. On a pu également distinguer par cette méthode les cytoplasmes mâle-stériles et "normaux" chez le Sorgho (PRING *et al.*, 1980).

Chez le Tabac, la fusion de protoplastes entre lignées différant par des marqueurs nucléaires et cytoplasmiques a permis la régénération de plantes présentant des modifications touchant la morphologie florale (BELLIARD *et al.*, 1978). Ces plantes ne différaient que par leur contenu cytoplasmique. Plus la morphologie florale se rapproche de l'état normal mâle-fertile, plus l'ADN mitochondrial analysé par les enzymes de restriction est semblable au diagramme du cytoplasme *tabacum* (non stérilisant). Les auteurs établissent ainsi une corrélation entre le nombre de fragments d'ADN mitochondrial d'un type et le degré de modification du phénotype floral (BELLIARD, 1979 ; BELLIARD *et al.*, 1979).

On peut étudier les produits de la synthèse protéique de mitochondries isolées dans un système acellu-

laire. Les auteurs (FORDE *et al.*, 1978 ; FORDE & LEAVER, 1980) distinguent ainsi les cytoplasmes T, N et S du Maïs, chaque cytoplasme présentant un électrophorégramme protéique spécifique.

Les différents cytoplasmes du Maïs peuvent également être distingués par la fréquence et la taille des molécules d'ADN mitochondrial lors de leur observation et comptage en microscopie électronique (LEVINGS *et al.*, 1979)

c) Conclusion

L'ensemble de ces travaux constitue un faisceau d'arguments qui tend à conforter l'hypothèse d'un déterminisme mitochondrial de la stérilité mâle cytoplasmique, chez le Maïs notamment. Pourtant aucun d'entre eux ne constitue une preuve. Dans tous les cas on établit une corrélation entre l'activité, la structure ou l'information des mitochondries et un phénotype mâle-stérile. Dans le seul cas cité du Tabac (BELLIARD *et al*, 1979) la modification de l'un est associée à la modification de l'autre. Si l'argument est là plus fort, il n'établit pas encore l'évidence d'une relation causale.

o

o o

Nous nous sommes intéressés à la stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba*, la Fève ou Fèverole. Le problème agronomique est important. L'augmentation et la régularisation des rendements, que permettent les hybrides de première génération, dépendent de l'obtention d'un cytoplasme mâle-stérile utilisable en sélection. Or chez cette espèce, les deux cytoplasmes connus sont instables.

La publication qui suit fait le point des connaissances, des hypothèses et des propositions que l'on pouvait formuler en 1976.

Dans le texte qui lui fait suite, on décrira brièvement la plante et la méthode.

Ann. Amélior. Plantes, 1977, 27 (2), 203-209.

La stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* L. I. — Historique et hypothèses

H. THIELLEMENT

Laboratoire d'Amélioration des Plantes, Université de Paris-Sud-Orsay, Bât. 360, 91405 Orsay Cédex

Résumé

Les particularités de la stérilité mâle cytoplasmique de la Féverole (et du Mil) peuvent être rapprochées des phénomènes cytoplasmiques observés dans les genres *Drosophila* et *Paramecium*. Une interprétation en termes d'équilibre entre 2 types de cytoplasmones est proposée. Parmi les hypothèses de travail avancées, le génotype du mainteneur, la transmission par le pollen et l'hétérogénéité de la lignée femelle, l'accent est mis sur la variabilité cytoplasmique probable de la lignée mâle-stérile. On peut, de ce fait, envisager une sélection de type somatique ou maternelle pour aboutir à un cytoplasme stable.

I. — Historique

1. — *Introduction*

L'exploitation du potentiel agronomique de la Féverole (*Vicia faba* L.) ne peut se réaliser qu'à travers l'utilisation de l'hétérosis.

La stérilité mâle cytoplasmique découverte chez cette espèce par BOND (1966) rendait possible l'obtention en quantité commercialisable de semences hybrides de première génération. Malheureusement cette source d'andro-stérilité, comme d'ailleurs la seconde trouvée par BERTHELEM quelques années plus tard, s'est révélée inutilisable en sélection à cause de son « instabilité ».

Les cas d' « instabilité » de la stérilité mâle cytoplasmique, c'est-à-dire l'apparition de plantes ou de secteurs de phénotype fertiles dans la descendance du croisement mâle-stérile par mainteneur ont été signalés chez un certain nombre d'espèces d'intérêt agronomique. Outre la Féverole, on peut citer le Mil pénicillaire

(SEQUIER, 1971; CLEMENT, 1975), le Maïs sur cytoplasme U.S.D.A. (SINGH et LAUGHNAN, 1972) et récemment le Tournesol (LECLERCQ; VEAR).

Chez le Maïs et chez le Tournesol, on a pu montrer qu'une partie au moins des plantes fertiles observées, alors que l'on attend une descendance entièrement stérile, résulte de l'apparition d'un gène de restauration (chez le Maïs, mutation $rf_3 \rightarrow Rf_3$, LAUGHNAN et GABAY, 1975).

Par contre, chez le Mil et la Féverole, les plantes ou les secteurs fertiles constatés se comportent comme des mainteneurs de stérilité. Dans ce cas le changement de phénotype de stérile vers fertile pourrait résulter d'une modification cytoplasmique.

2. — *Particularités*

Chez la Féverole, comme d'ailleurs chez le Mil (*Pennisetum typhoides*), on connaît au moins deux constitutions cytoplasmiques conférant la stérilité mâle (on les distingue par les gènes de restauration de la fertilité). Ils se comportent de la même façon :

1) le taux de retour à la fertilité varie selon le génotype du mainteneur (BERTHELEM, 1970; PICARD (J.), 1972, sur la Féverole; CLEMENT, 1975, sur le Mil);

2) le retour à la fertilité peut avoir lieu au sein d'une plante stérile (BOND *et al.*, 1966);

3) chez la Féverole, la stérilité mâle cytoplasmique présente une autre particularité : la restauration permanente. La F_1 du croisement mâle-stérile par restaurateur, autofécondée, ne donne que des plantes fertiles alors que l'on attend environ un quart de stériles (1 gène majeur de restauration). Dans cette descendance fertile on retrouve des mainteneurs, ce qui différencie cette restauration permanente d'une restauration gamétophytique (cytoplasme U.S.D.A. du Maïs). Dans ce cas tout se passe comme si le cytoplasme stérile, une fois mis au contact avec le (s) gène (s) de restauration, était redevenu fertile.

3. — *Interprétations*

CLEMENT (1975) qui étudie la stérilité mâle cytoplasmique du Mil, interprète ces phénomènes d'instabilité phénotypique en termes de mutations de cytoplasmones (génomes cytoplasmiques). Le taux de mutation variable selon le génotype résulterait de l'existence d'un gène mutateur à pénétrance variable. C'est-à-dire que ce gène, qui provoque la mutation du cytoplasme de stérile vers fertile, s'exprimerait différentiellement selon le contexte génétique.

On pourrait interpréter ces phénomènes en termes de modifications d'équilibres cytoplasmiques.

Considérons l'hypothèse du support mitochondrial de la stérilité mâle cytoplasmique, émise pour la première fois par RHOADES (1943) puis reprise et développée notamment par BERVILLÉ et DEMARLY (1970). Cette hypothèse a été récemment confortée par la mise en évidence par LEVINGS et PRING (1976) de différences

dans la structure du D.N.A. mitochondrial entre Maïs de cytoplasme normal et Texas (mâle-stérile). En reprenant les idées de DEMARLY (1974), sur la pluralité des populations mitochondriales, on peut concevoir qu'au sein des plantes mâle-stériles instables, coexistent deux types d'organites. Nous appelerons « compatible » le type conduisant à la viabilité du pollen et « incompatible » le type conduisant à la stérilité mâle. Les plantes mâle-stériles instables sont alors des plantes où, si en général le type « incompatible » prédomine, il arrive qu'au cours des mitoses une ségrégation somatique occasionne une nouvelle répartition des deux types. Et les cellules filles qui vont être à l'origine d'un rameau ou d'un secteur de la plante seront constituées par le type « compatible ». Ceci permet de rendre compte également des plantes ou rameaux de phénotype intermédiaire, semi-fertiles ou semi-stériles.

En considérant l'hypothèse du support viral de la stérilité mâle cytoplasmique (ATANASOFF, 1971), on pourrait concevoir de la même façon une ségrégation de particules virales entraînant l'apparition de secteurs guéris. Il faudrait alors admettre d'une part qu'il peut y avoir guérison spontanée au sein d'une plante et que, d'autre part, le virus ne peut plus réinvestir les secteurs guéris (irréversibilité du phénomène) ni se transmettre par greffe (BOND *et al.*, 1966).

Récemment, EDWARDSON *et al.*, (1976) ont mis en évidence dans les cellules des plantes et des talles stériles de Féverole, des corps sphériques cytoplasmiques (C.S.B. : Cytoplasmic Spherical Bodies) d'apparence virale. Les auteurs eux-mêmes ne peuvent affirmer s'il s'agit là des agents viraux, causes de la stérilité mâle, ou d'une conséquence d'un état cytoplasmique particulier.

II. — Analogies

Chez *Drosophila melanogaster*, PICARD G. (1971) a mis en évidence un cas de stérilité femelle à déterminisme cytoplasmique. Ce phénomène, apparu au cours de croisements entre souches, dépend à la fois de facteurs cytoplasmiques (facteurs « Réacteur ») et de facteurs liés au génome nucléaire (facteurs « Inducteur »). Outre la ressemblance avec la stérilité mâle cytoplasmique chez les végétaux, l'étude a montré (BUCHETON et PICARD G., 1975) que les modifications induites par le vieillissement (les femelles âgées sont plus fertiles) se maintiennent, bien qu'en s'atténuant, au cours des générations. On peut penser, en reprenant l'hypothèse des auteurs (BUCHETON, 1973), qu'il y a eu une sorte de dérive au sein de populations de particules cytoplasmiques.

Chez *Paramecium aurelia*, si l'on injecte dans une souche sauvage des mitochondries porteuses de mutations, par exemple de résistance au chloramphénicol ou à l'érythromycine, ces dernières vont progressivement être éliminées (ADOUTTE et BEISSON, 1972). Inversement, des mitochondries sauvages au contact d'un génome d'un type donné (porteur de la mutation cl-1 /cl-1) vont progressivement disparaître; seul subsistera le type mitochondrial compatible avec cette mutation (SAINSARD *et al.* 1974). La vitesse d'élimination du type mitochondrial incompatible peut varier entre une dizaine et quelques centaines de générations cellulaires.

III. — Hypothèses explicatives

Pour tenter d'expliquer les trois particularités de la stérilité mâle cytoplasmique de la Féverole (instabilité phénotypique, reversion somatique, restauration permanente) trois types d'hypothèses peuvent être avancées.

1. — *Le génotype du mainteneur*

On peut penser qu'au cours des rétrocroisements effectués pour introduire des lignées d'intérêt agronomiques dans le cytoplasme mâle-stérile, on amène à l'état homozygote des gènes mineurs récessifs de restauration, ce qui pourrait expliquer qu'une fraction de la descendance retourne à l'état fertile.

Cette hypothèse ne rend pas compte des reversions somatiques ou alors il faut admettre, comme pour le modèle de CLEMENT d'un gène mutateur, que ces gènes peuvent se manifester au cours du développement de la plante.

BERTHELEM (1970) a superposé au programme de conversion des lignées d'intérêt agronomique en mâle stérile, la sélection généalogique du parent mâle. On aurait du, dans ce cadre, trouver les arrangements géniques favorables à l'expression de la stérilité mâle, écarter les allèles responsables de la reversion phénotypique, ou le gène mutateur.

2. — *La transmission par le pollen*

On peut imaginer qu'à chaque rétrocroisement de la lignée mâle stérile par le mainteneur, ce dernier amène une fraction de son cytoplasme par le tube pollinique. Les cytoplasmones « compatibles » ainsi introduits se multiplieraient plus ou moins vite selon le contexte génétique. Un phénomène de ce type concernant les chloroplastes (plastidomes) est décrit chez *Pelargonium* (TILNEY-BASSET, 1963, 1965, 1970). Ce type d'explication pourrait rendre compte de l'hétérogénéité cytoplasmique et de la restauration permanente. Le restaurateur se définirait comme une plante qui fait passer systématiquement ses cytoplasmones « compatibles », que la moitié mâle du génome (ou le noyau hybride) sélectionne rapidement en quelques dizaines ou centaines de divisions cellulaires. Les mainteneurs seraient alors caractérisés par leur moindre aptitude à transmettre leurs cytoplasmones et / ou à les sélectionner. Mais cette distinction restaurateur-mainteneur est compliquée par le fait que chez la Féverole (comme d'ailleurs chez le Mil) on connaît au moins deux constitutions cytoplasmiques stériles. Et une même lignée mâle, porteuse de cytoplasmones compatibles (et du génome sélectif correspondant) peut restaurer un cytoplasme et maintenir l'autre.

3. — *L'hétérogénéité de la lignée femelle*

On trouve entre les plantes d'une même lignée mâle-stérile cytoplasmique instable, comme entre les tiges d'une même plante, une grande variabilité au niveau de l'expression de la stérilité mâle. Que l'on examine le taux d'autoféconda-

tion sur les chandelles de Mil ou la structure du pollen par observation cytologique des étamines de Féverole, on trouve tous les intermédiaires possibles entre une plante ou un secteur entièrement stérile (0 graines en autofécondation, tous les grains de pollen vides de cytoplasme) et une plante ou un secteur entièrement fertile (grenaison abondante en autofécondation, pollen normal). L'hypothèse peut alors se formuler ainsi : dans une lignée mâle-stérile cytoplasmique instable, les plantes possèdent deux types de cytoplasmones (de chondriomes?) en proportions variables. Le génome nucléaire intervient comme un agent sélectif. Ceci permet de rendre compte du taux de retour à la fertilité, variable selon le génotype, de la restauration permanente et de la réversion somatique. En effet, on peut concevoir qu'au cours de la morphogenèse de la plante, en fonction des conditions de milieu, et suivant les mécanismes de répression /dérépression, le rôle sélectif du noyau puisse varier.

IV. — Incidences agronomiques, application et vérification

Les phénomènes d' « instabilité », tels qu'ils sont décrits plus haut, ont pour conséquence évidente l'impossibilité d'obtenir une population entièrement hybride. En effet, on récolte sur la lignée femelle une fraction plus ou moins importante de graines issues d'autofécondations. Le faible pouvoir de multiplication de la Féverole implique 4 à 5 générations de multiplication en champ, sans tri possible, de la lignée mâle-stérile. Les retours à la fertilité pollinique entraînent une telle chute du rendement attendu du lot hybride que l'exploitation commerciale en est impossible. Les hypothèses proposées permettent d'envisager une solution à ce problème agronomique. Elle consisterait en une sélection à l'intérieur de la variabilité cytoplasmique probable d'une lignée mâle-stérile.

Une expérience entreprise par SEQUIER (1975) sur le Mil est à cet égard démonstrative. Au Sénégal, en retenant sur la lignée Tift. 239 d_2A_2 (mâle-stérile) les chandelles les moins stériles et en les autofécondant, on arrive par autofécondations successives à accroître significativement la fertilité des plantes. Néanmoins, il reste encore chez ces plantes « presque fertiles », après 3 cycles d'autofécondation, suffisamment de variabilité entre les chandelles (entre les tiges) pour qu'on puisse envisager une démarche inverse, vers la stérilité.

Sur la Féverole, où le problème agronomique est plus aigu, on envisage une approche similaire. En multipliant par voie végétative (AUBRY *et al.*, 1975; THIELLEMENT, 1975) et / ou par voie sexuée, les secteurs où le taux de retour à la fertilité est le moins fréquent, ou bien les plantes où la stérilité mâle est la plus complète, on espère appauvrir progressivement (ou brutalement) la plante en cytoplasmones « compatibles ».

Reste posé le problème de l'origine de l'hétérogénéité cytoplasmique d'une plante mâle-stérile « instable », la fréquence de ce phénomène conditionnant l'efficacité de la sélection somatique ou maternelle.

Soit l'hétérogénéité préexistait dans les deux plantes retenues, l'une par BOND (cytoplasme anglais dit « 447 »), l'autre par BERTHELEM (cytoplasme « 350 »), et a été depuis entretenue au cours des programmes de conversion.

Soit l'hétérogénéité cytoplasmique est due à une mutation (réverse « incompatible » → « compatible ») ou au passage par le pollen d'éléments « compatibles ». Dans ce cas, la sélection pour le mainteneur doit avoir prise sur le phénomène, le taux de mutation ou de transmission étant lié au génotype du parent récurrent.

Conclusion

En retenant l'interprétation de la stérilité mâle cytoplasmique chez la Féverole en termes de modifications d'équilibre de populations de cytoplasmones, et pour rendre compte des trois particularités (instabilité phénotypique, réversion somatique, restauration permanente), le génome nucléaire est considéré comme un agent sélectif. Il s'ensuit que la sélection généalogique pour le mainteneur qui a pu être entreprise, constitue une phase indispensable. Il semble néanmoins qu'une lignée mâle-stérile instable est hétérogène du point de vue cytoplasmique. En conséquence, une sélection à l'intérieur de la variabilité existante entre les plantes (ou entre les différents secteurs d'une même plante) doit permettre de progresser vers la stabilisation du cytoplasme mâle-stérile.

Reçu pour publication en mai 1976.

Remerciements

Je tiens à remercier MM. A. BERVILLÉ et J. SEQUIER pour de fructueuses discussions et MM. Y. DEMARLY, P. DOMMERGUES, G. PELLETIER et Mlle F. VEAR qui ont contribué par leurs critiques constructives à l'élaboration de cette note.

Summary

Cytoplasmic male-sterility in Vicia faba *L.*
I. — *Historical and hypothetical aspects*

Instability of cytoplasmic male-sterility in field bean (*Vicia Faba* L) is described. The particularities observed in cytoplasmic phenomena in *Drosophila* and *Paramecium* may provide useful comparisons. An interpretation in terms of equilibrium between cytoplasmic populations is presented. Among the proposed hypothesis, accent is put on cytoplasmic heterogeneity of the male-sterile line. A somatic or maternal type of selection may, in this case, provide the stability of the male-sterile cytoplasm.

Références bibliographiques

ADOUTTE A., BEISSON J., 1972. Evolution of mixed populations of genetically different mitochondria. *Nature*, **235**, 393.

ATANASOFF D., 1971. The viral nature of cytoplasmic male sterility in plants. *Phytopathol. Z.*, **70**, 306-322.

AUBRY A.-M., DUTUIT P., THIELLEMENT H., BERVILLÉ A., 1975. Propagation végétative de la Féverole (*Vicia faba*) à partir de fragments de tiges. *Ann. Amélior. Plantes*, **25**, 225-229.

BERTHELEM P., 1970. *Rapport d'activité de la Station de Rennes, I.N.R.A.*, 1968-1970.

BERVILLÉ A., DEMARLY Y., 1970. La stérilité mâle cytoplasmique chez les Végétaux. *Eucarpia. La stérilité mâle chez les plantes horticoles.* Versailles, 147-161.

BOND D.-A., FYFE J.-L., TOYNBEE-CLARKE G., 1966. Male-sterility in field beans III — Male-sterility with a cytoplasmic type of inheritance. *J. agric. Sci.*, **66**, 359-367.

BUCHETON A., 1973. Contribution à l'étude de la stérilité femelle non mendélienne chez *Drosophila melanogaster*. Transmission héréditaire des degrés d'efficacité du facteur « réacteur ». *C. R. Acad. Sci. Paris*, série D, **276**, 641-644.

BUCHETON A. et PICARD G., 1975. Mise en évidence d'une influence partiellement héritable de l'âge sur un phénomène de stérilité femelle à déterminisme non mendélien. *C.R. Acad. Sci. Paris*, série D, **281**, 1 035-1 038.

CLEMENT W. M., 1975. Plasmon mutations in cytoplasmic male-sterile pearl millet, *Pennisetum typhoides*. *Genetics*, **79**, 583-588.

DEMARLY Y., 1974. Quelques données nouvelles en amélioration des Plantes *Agron. tropicale*, **29**, 9, 871-891.

EDWARDSON J.-R., BOND D.-A. and CHRISTIE R.-G., 1976. Cytoplasmic sterility factors in *Vica Faba L.* III *Genetics*, **82**, 443-449.

LAUGHNAN J.-R. and GABAY S.-J., 1973. Mutations leading to nuclear restoration of fertility in S male sterile cytoplasm in Maize. *Theor. appl. Genet.*, **43**, 109-116.

LECLERCQ P. (non publié).

LEVINGS III C. S. and PRING D.-R., 1976. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA form normal and Texas cytoplasmic male-sterile maize. *Science*, **193**, 158-160.

PICARD J., 1972. *Rapport d'activité de la Station de Dijon. I.N.R.A.*, 1968-1972.

PICARD G., 1971. Un cas de stérilité femlle chez *Drosophila melanogaster* lié à un agent transmis maternellement. *C.R. Acad. Sci. Paris*, série D, **272**, 2 484-2 487.

RHOADES M.-M., 1943. Genic induction of inherited cytoplasmic difference. *Proc. Nat. Acad. Sci, U.S.A.*, **29**, 327-329.

SAINSARD A., CLAISSE M., BALMEFREZOL M., 1974. A nuclear mutation affecting structure and function of mitochondria in *Paramecium Molec. gen. Genet.*, **130**, 113-125.

SEQUIER J., 1971, 1972, 1973, 1974. *Rapports d'activité O.R.S.T.O.M.*

SEQUIER J., 1975. *Étude de la stabilité de la stérilité mâle cytoplasmique chez la lignée de mil penicillaire. Tifton* 239 *DA* . D.E.A. Université de Paris-Sud, Orsay, 18 p.

SINGH A. and LAUGHNAN J.-R., 1972. Instability of S male-sterile cytoplasm in maize. *Genetics*, **71**, 607-620.

THIELLEMENT H., 1975. *Sur la stérilité mâle cytoplasmique de la Féverole. Multiplication végétative par bouturage* in vitro *de mâles-stériles cytoplasmiques et de mâles fertiles isogéniques*. D.E.A. Université de Paris-Sud, Orsay, 36 p.

TILNEY-BASSET R.A.E., 1963, 1965, 1970. Genetics and plastid physiology in *Pelargonium*. *Heredity*, **18**, 485-504, **20**, 451-466, **25**, 89-103.

VEAR F. (non publié).

C - LA PLANTE

L'espèce *Vicia faba* Linné (2n=12) peut être cloisonnée en sous-espèce *minor* (féveroles), *equina*, *paucijuga*, *major* (fèves) selon la grosseur du grain. Elles sont toutes interfertiles et représentent des groupes de populations au sens de MAYR (1974).

Les premières traces de culture datent de l'Age du Bronze, le centre de domestication étant vraisemblablement le Proche-Orient (CUBERO, 1974) ou l'Afghanistan (LADIZINSKY, 1975). De là l'aire de dispersion s'étend jusqu'à l'Inde à partir de la Mésopotamie, à l'Ethiopie le long de la vallée du Nil, à l'Europe par l'Afrique du Nord et l'Espagne.

Aujourd'hui on la cultive sur les cinq continents, du Canada et de la Suède jusqu'en Afrique subtropicale. Chez cette espèce très plastique, la variabilité phénotypique et génétique est très grande. C'est la quatrième espèce légumineuse à graine comestible cultivée dans le monde. La production mondiale est de 6 M de tonnes par an dont les deux tiers en Chine (HAWTIN & STEWART in FABIS, 1979).

Vicia faba est une Papillonacée qui se caractérise dans la tribu des Viciées par sa tige creuse tétragone ailée. C'est une herbacée annuelle qui porte des feuilles alternes composées et pennées, de 2 à 7 folioles ovales-oblongues. Ses fleurs hermaphrodites blanches, plus ou moins tachées de violet ou de noir, sont réunies en fausses grappes axillaires courtes qui apparaissent entre le cinquième et le dixième noeud foliaire, quand la lumière est en quantité suffisante.

La plante émet des tiges secondaires à partir des bourgeons axillaires les plus basaux, voire à partir de bourgeons cotylédonnaires. Ces tiges secondaires sont couramment appelées talles bien que ce terme soit impropre au sens botanique. Le "tallage" est fonction des conditions de culture (richesse du sol, densité de peuplement) et de facteurs génétiques. (PICARD 1972 ; BERTHELEM & LEGUEN, 1974).

Le régime de reproduction est mixte. Le taux d'allogamie dépend de la population et du milieu (lieu, année) mais aussi du taux d'homozygotie, il varie entre 40 et 70 p. cent (PICARD, 1953 ; DRAYNER, 1956). La pollinisation et le déclenchement des fleurs sont assurés par les bourdons et les abeilles. Dans cette faune pollinisatrice les visites "efficaces" sont surtout dues, dans nos régions, à *Bombus hortorum, B. lapidarius* et à une abeille solitaire *Eucera tuberculata* (TASEI, 1976).

Le fruit est une gousse allongée, noire à maturité, qui contient jusqu'à huit graines provenant d'ovules campylotropes. Le taux de multiplication est de l'ordre de 10 à 20 en condition de champ. Cette très faible fertilité (ROWLANDS, 1964 ; KAMBALL, 1969 ; FREE & WILLIAMS, 1976) serait due à des phénomènes de compétition physiologique entre les organes végétatifs (croissance indéfinie de l'apex) et les organes reproducteurs (formation et maturation des graines) (JAQUIERY & KELLER, 1978 ; CHAPMAN *et al*, 1978,1979).

Comme pour les autres légumineuses l'association symbiotique de ses racines avec *Rhyzobium leguminosarum* laisse un sol enrichi en azote (20 à 40 kg/ha). Il existe

une importante interaction entre souches bactériennes et variétés de plantes (MYTTON *et al.*, 1977). Ce phénomène est une composante du rendement généralement négligée.

L'intérêt agronomique de *Vicia faba* (voir PICARD, 1975 ; BERTHELEM, 1976 ; ABDALLA, 1976 ; DUC, 1978) vient de la richesse de ses graines en protéines (20 à 35 % de la matière sèche). Dans le monde la fève est surtout réservée à l'alimentation humaine. Mais la teneur de ses protéines en lysine (entre 6 à 7 g pour 16 g d'azote) la rend également intéressante en Europe occidentale et en Amérique du Nord comme complément des céréales pour l'alimentation du bétail.

Les rendements actuels sont faibles, de l'ordre de 30 à 40 qx/ha, et très irréguliers d'une année sur l'autre. L'utilisation de la vigueur hybrique mise en évidence par BOND *et al.* (1964) permettrait d'exploiter au mieux les potentialités agronomiques de cette espèce en augmentant et régularisant les rendements. La fabrication en quantités commercialisables d'hybrides de première génération passe,chez cette espèce auto-allogame aux multiples fleurs hermaphrodites, par l'utilisation de la stérilité mâle cytoplasmique.

PHOTO 1: Un plant de féverole. On peut remarquer d'où proviennent les tiges secondaires.

PHOTO 2 : Le dispositif en serre. L'espacement des plantes permet les observations individuelles.

PHOTO 3 : Les fleurs. Sur le bouquet du bas, les fleurs sont déjà ouvertes et sur celui du milieu elles sont au stade où on les observe.

D - METHODOLOGIE

La résolution du problème posé aux agronomes - l'instabilité de la stérilité mâle cytoplasmique - nous semblait devoir passer par une meilleure compréhension du phénomène, autrement dit par une étude de type fondamental.

L'hypothèse de travail retenue d'une hétérogénéité génétique du cytoplasme mâle stérile instable permettait de combiner une approche fondamentale et une sélection maternelle, cytoplasmique.

L'abord biochimique nous a paru inadapté. Les tests envisagés (activité mitochondriale, analyse des constituants cytoplasmiques) n'auraient pu s'effectuer qu'à partir de lots de graines et *a priori* un lot de graines mâle-stériles de fèves n'est pas homogène. Cette approche nous a surtout semblé prématurée, du fait de la méconnaissance des modalités d'expression et de transmission du caractère.

Nous avons choisi d'observer le phénotype pollinique d'une lignée mâle-stérile supposée homozygote fixée et de suivre son expression par une méthodologie génétique classique (croisements, autofécondations) au cours de cinq générations successives en serre.

Dans la partie "Expérimentation" les résultats obtenus et leurs interprétations seront exposés, sous forme de publications, dans l'ordre chronologique où ils ont été obtenus. Dans la dernière partie, une brève synthèse du travail présenté dans ce mémoire précèdera la discussion générale.

L'objectif pratique, c'est-à-dire l'obtention d'un cytoplasme stable, n'a pas été atteint mais la démonstration de l'hétérogénéité génétique permet de mieux comprendre, pour mieux contrôler, les manifestations d'un cytoplasme instable.

BIBLIOGRAPHIE DE L'INTRODUCTION

ABDALLA M.M.F. 1976. Natural variability and selection in some local and exotic populations of field beans, *Vicia faba* L.Z. Pflanzenzüchtg. 76 : 334-343.

ATANASOFF D. 1964. Viruses and cytoplasmic heredity. Z. Pflanzenzüchtg. 51 : 197-214.

ATANASOFF D. 1971. The viral nature of cytoplasmic male sterility in plants. Phytopath. Z. 70 : 306-322.

AURIAU P., PLUCHARD P. & de BUYSER J. 973. Hérédité de la restauration de la fertilité mâle chez les blés hybrides Ann. Amélior. Plantes 23 : 315-332.

BARBIER H. 1978. Quelques anomalies de la morphogenèse pollinique étudiées sur trois systèmes de stérilité mâle chez le Mil (*Pennisetum americanum*). Thèse de 3° cycle. U. Paris-Sud. 79 p.

BARRATT D.H.P. & FLAVELL R.B. 1975. Alterations in mitochondria associated with cytoplasmic and nuclear genes concerned with male sterility in maize. Theoret. Appl. Genetics 45 : 315-321.

BECKETT J.B. 1971. Classification of male sterile cytoplasms in maize (*Zea mays* L.) Crop Sci. 11 : 724-727.

BEISSON J. & SONNEBORN T.M. 1965. Cytoplasmic inheritance of the organization of the cell cortex in *Paramecium aurelia*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 53 : 275-282.

BELLIARD G. 1979. Génétique cytoplasmique par fusion somatique chez les *Nicotiana* : mise en évidence du support mitochondrial de la stérilité mâle cytoplasmique et induction de variabilité par recombinaison. Thèse d'Etat. U. Paris-Sud n° 2224.

BELLIARD G., PELLETIER G., VEDEL F. & QUETIER F. 1978. Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic parasexual hybrids of *Nicotiana tabacum*. Molec. gen. Genet. 165 : 231-237.

BELLIARD G., PELLETIER G. & VEDEL F. 1979. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. Nature 281 : 401-403.

BERTHELEM P. 1976. Amélioration génétique de la Féverole. Cultiva nov. 1976. : 48-53.

BERVILLE A. & DEMARLY Y. 1970. La stérilité mâle cytoplasmique chez les Végétaux. C.R. réunion Eucarpia, Versailles : 147-165.

BERVILLE A. & CASSINI R. 1974. Effets comparatifs de la toxine produite par *Heminthosporium maydis* race T sur des mitochondries isolées de maïs à cytoplasme mâle-stérile Texas et à cytoplasme normal. C.R.Acad.Sc. Paris 278 série D : 885-888.

BERVILLE A., LE PIERRES D. & FEYT H.1974.Mise en évidence d'une résistance temporaire au cyamre des mitochondries de Blé hexaploïde mâle-stérile cytoplasmique. C.R. Acad. Sc. Paris 279 série D : 1621-1624

BOND D.A., DRAYNER J.M., FYFE J.L. & TOYNBEE-CLARKE G. 1964. Male sterility in field beans. II Yield trials of F1 hybrids winter beans produced with the aid of male sterility. J. agric. Sci. Cambridge 63 : 235-243.

BOND D.A., FYFE J.L. & TOYNBEE-CLARKE G. 1966. Male sterility in field beans. IV. Use of cytoplasmic male sterility in the production of F1 hybrids, and their performance in trial. J. agric. Sci.Cambridge 66 : 369-377.

BURNHAM C.R. 1978. Cytoplasmic restoration of nuclear genetic male sterility. Maize Genet. Coop. Newslett. 52 : 72.

CHAPMAN G.P., GUEST H.L. & PEAT W.E. 1978. Top-removal in single stem plants of *Vicia faba* L.Z. Pflanzenphysiol. 89 : 119-127.

CHAPMAN G.P., FAGG. C.W. & PEAT W.E. 1979. Parthenocarpy and internal competition in *Vicia faba* L.Z. Pflanzenphysiol. 94 : 247-255.

CUBERO J. 1974. On the evolution of *Vicia faba* L. Theoret. Appl. Genetics. 45 : 47-51.

CURTIS G.J. 1967. Graft-transmission of male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Euphytica 16 : 419-424.

DEMARLY Y. 1974. Quelques données nouvelles en amélioration des plantes. L'Agronomie Tropicale 29 : 871-891.

DEMARLY Y. 1977. Génétique et amélioration des plantes. Masson

DRAYNER J.M. 1956. Regulation of out-breeding in field beans (*Vicia faba*). Nature 117 : 489-490.

DUC G. 1978. Modalités d'expression et hypothèses explicatives du manque de stabilité de la stérilité mâle cytoplasmique de la féverole (*Vicia faba* L.) Thèse Dr. Ir. U. Paris-Sud. 46 p.

EDWARDSON J.R. 1970. Cytoplasmic male sterility. Bot. Rev. 36 : 341-354.

EDWARDSON J.R. & CORBETT M.K. 1961. Asexual transmission of cytoplasmic male sterility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47 : 390-396.

EDWARDSON J.R., BOND D.A. & CHRISTIE R.G. 1976. Cytoplasmic sterility factors in *Vicia faba* L. Genetics 82 : 443-449.

FORDE B.G., OLIVER R.J.C. & LEAVER C.J. 1978. Variation in mitochondrial translation products associated with male sterile cytoplasms in maize. Proc.Natl.Acad.Sci.UASA 75: 3841-3845.

FORDE B.G. & LEAVER C.J. 1980. Nuclear and cytoplasmic genes controlling synthesis of variant mitochondrial polypeptides in male-sterile maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 418-422.

FRANKEL R. 1956. Graft induced transmission to progeny of cytoplasmic male sterility in Petunia. Science 124 : 684-685.

FRANKEL R. 1962. Further evidence of graft induced transmission to the progeny of cytoplasmic male sterility. Genetics 47 : 641-646.

FREE J.B. & WILLIAMS I.H. 1976. Pollination as a factor limiting the yield of field beans. J. agric. Sci. Cambridge 87 : 395-399.

GRAHAM R.D. 1975. Male sterility in wheat plants deficient in copper. Nature 254 : 514-515.

GREGORY P., GRACEN V.E., YODER O.C. & STEINKRAUS N.A. 1977. Differential effects of digitonin on mitochondria isolated from male sterile and non male sterile cytoplasms of corn. Plant Sci. Lett. 9 : 17-31.

GRUN P., AUBERTIN M. & RADLOW A. 1962. Multiple differenciation of plasmons of diploid species of *Solanum*. Genetics 47 : 1321-1333.

IZHAR S. 1977. Cytoplasmic male sterility in Petunia. II. The interaction between the plasmagene, genetic factors and temperature. J. Hered. 68 : 238-240.

IZHAR S. & FRANKEL R. 1976. Cytoplasmic male sterility in petunia. I. Comparative study of different plasmatype sources. J. Hered. 67 : 43-46.

JAQUIERY R. & KELLER E.R. 1978. La chute des fruits chez la féverole (*Vicia faba* L.) en relation avec la disponibilité en assimilats marqués au ^{14}C. Revue suisse Agric. 10. 123-127.

KAMBAL A.E. 1969. Flower drop and fruit set in field beans *Vicia faba* L.J. agric. Sci. Cambridge 72 : 131-138.

KOEPPE D.V., COX J.K. & MALONE C.P. 1978. Mitochondrial heredity : a determinant in the toxin response of maize to the insecticide methomyl. Science 201:1227-1229.

LABIB A. 1977. Activité et structure des mitochondries isolées durant la germination chez le Blé tendre. Relations avec l'hétérosis et la stérilité mâle cytoplasmique. Thèse 3° cycle U. Paris-Sud.

LADIZINSKY G. 1975. On the origin of the broad bean, *Vicia faba* L. Isr. J. Bot. 24 : 80-88.

LASER K.D. & LERSTEN N.R. 1972.Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. Bot. Rev. 38 ; 425-454.

LEE S.-L.J. & WARMKE H.E. 1979. Organelle size and number in fertile and T-cytoplasmic male sterile corn. Amer.J. Bot. 66 : 141-148.

LEE S.-L.J., GRACEN V.E. & EARLE E.D. 1979. The cytology of pollen abortion in C-cytoplasmic male-sterile corn anthers. Amer. J. Bot. 66 : 656-667.

LEVINGS III C.S. & PRING D.R. 1976. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic male sterile maize. Science 193: 158-160.

LEVINGS III C.S. & PRING D.R. 1979. Molecular bases of cytoplasmic male sterility in maize. In "Physiological Genetics" ed. SCANDALIOS et al. Academic Press. 171-193.

LEVINGS III C.S., SHAH D.M., HU W.W.L., PRING D.R. & TIMOTHY D.H. 1979. Molecular heterogeneity among mitochondrial DNAs from different maize cytoplasms. In "Extrachomosomal DNA" ed. CUMMINGS et al. Academic Press. 63-73.

L'HERITIER P. 1975. Génétique. Masson.

LICHTER R. 1978. The restoration of male fertility in cytoplasmic male sterile sugar beet by heat treatment and meristem culture. Z.Pflanzenzüchtg. 81 : 159-165.

MARREWIJK G.A.M. VAN. 1969. Cytoplasmic male sterility in Petunia. I. Restoration of fertility with special reference to the influence of environment. Euphytica 18 : 1-20.

MAYR E. 1974. Populations, espèces et évolution. Hermann.

MEER Q.P. VAN DER & BENNEKOM J.L. VAN. 1978. Effect of temperature on sex expression in onion (*Allium cepa* L.). Neth. J. agric. Sci. 26 : 41-44.

MEYER V.G. 1969. Some effects of genes, cytoplasm and environment on male sterility of cotton (*Gossypium*). Crop Sci. 9 : 237-242.

MEYER V.G. 1970. A facultative gymnosperm from an interspecific cotton hybrid. Science 169 :886-888.

MILLER R.J. & KOEPPE D.E. 1971. Southern corn leaf blight : susceptible and resistant mitochondria. Science 173 : 67-69.

MYTTON L.R., EL SHERBEENY M.M. & LAWES D.A. 1977. Symbiotic variability in *Vicia faba*. 3. Genetic effects of host plant, Rhizobium strains and host x strain interaction. Euphytica 26 : 785-791.

NANNEY D.L. 1968. Cortical patterns in cellular morphogenesis. Science 160 : 496-502.

OCKENDON D.J. & GATES P.L. 1976. Variation in pollen viability in the onion (*Allium cepa*). Euphytica 25 : 753-759.

PICARD J. 1953. Recherches sur la Féverole. Ann. Amélior. Plantes 3 : 57-106.

PICARD J. 1975. Les protéagineux d'hiver : la Féverole et le Pois. Fourrages Actual. 11 : 3-11.

PREER J.R. Jr. Extrachromosomal inheritance : hereditary symbionts mitochondria, chloroplasts. Ann. Rev. Genetics 5 : 361-406.

PRING D.R., LEVINGS III C.S. & CONDE M.F. 1980. The organelle genomes of cytoplasmic male sterile maize and sorghum. in "The Plant Genome ed. DAVIES D.R. & HOPWOOD D.A. John Innes Charity. 111-120.

QUETIER F. & VEDEL F. 1977. Heterogeneous population of mitochondrial DNA molecules in higher plants. Nature 268 : 365-368.

RHOADES M.M. 1950. Gene induced mutation of heritable cytoplasmic factor producing male sterility in maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 36 : 634-635.

ROWLANDS D.G. 1964. Fertility studies in broad bean (*Vicia faba* L.) Heredity 19 : 271-277.

SARKISSIAN I.V. & McDANIEL R.G. 1967. Mitochondrial polymorphism in maize. I. Putative evidence for *de novo* origin of hybrid specific mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57 : 1262-1266.

SARKISSIAN I.V. & SRIVASTAVA H.K. 1967. Mitochondrial polymorphism in maize. II. Further evidence of correlation of mitochondrial complementation and heterosis. Genetics 57 : 843-850.

SINGH I.S. 1975. Effets de la température et du niveau floral sur la fertilité pollinique chez le Pétunia. Ann. Amélior. Plantes 25 : 365-370.

TASEI J.N. 1976. Les insectes pollinisateurs de la féverole d'hiver et la pollinisation des plantes mâles stériles en production de semences hybrides. Apidologie 7: 1-38.

THOMPSON T.E. & AXTELL J.D. 1978. Graft-induced transmission of cytoplasmic male sterility in alfalfa. J. Hered. 69: 159-164.

WARMKE H.E. & LEE S.-L. J. 1978. Pollen abortion in T cytoplasmic male sterile corn (*Zea mays*) : a suggested mechanism. Science 200 : 561-562.

II - EXPERIMENTATION

Ann. Amélior. Plantes, 1977, **27** (5), 547-553.

La stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* L.

II. — Hétérogénéité phénotypique d'une lignée mâle-stérile

H. THIELLEMENT

Laboratoire d'Amélioration des Plantes,
Université de Paris-Sud, Bât. 360,
91405 Orsay-Cedex

Résumé

Une lignée mâle-stérile de Féverole de printemps (Ad 23/447) a été observée tout le long de la floraison en serre. On note le phénotype (Stérile, Fertile, Intermédiaire) tous les 8 jours environ. Une fraction importante des plantes (62 sur 146) présente une modification du phénotype (S vers I) simultanément pour toutes les tiges d'une plante, mais chaque plante à un moment différent. Ce phénomène SVI, irréversible, peut être relié pour chaque plante à un même stade morphogénétique des différentes tiges.

L'hétérogénéité constatée des phénotypes (plantes S, I, F, SVI) est compatible avec l'hypothèse d'une hétérogénéité cytoplasmique. Elle pourrait être due également à une expression de la fertilité pollinique modifiée par le vieillissement des plantes ou les conditions de serre.

Introduction

La production de semences en quantités commercialisables d'hybrides de Féverole de première génération permettrait d'exploiter au mieux les potentialités agronomiques de ce protéagineux. L'utilisation de la stérilité mâle cytoplasmique semblait la voie la plus simple pour y parvenir (Bond *et al.*, 1966*b*).

Malheureusement, chez *Vicia faba*, les deux sources de cytoplasme mâle-stérile (« Cambridge 447 » de Bond *et al.*, 1966*a*; « Rennes 350 » de Berthelem, 1974) se sont révélées « instables », c'est-à-dire que lors des rétrocroisements du mainteneur sur la lignée mâle-stérile apparaissent des plantes fertiles et des plantes présentant à la fois des secteurs fertiles et des secteurs stériles. De plus, la restauration est permanente. La description de ces particularités et les interprétations qui peuvent en être faites ont été détaillées précédemment (Bond *et al.*, 1966*a* et *b*; Berthelem, 1970; Berthelem et Le Guen, 1974; Thiellement, 1977).

Il nous a paru intéressant, dans un premier temps, d'analyser les modalités

de cette instabilité phénotypique en étudiant, tout au long de la floraison, le phénotype pollinique d'une « lignée » mâle-stérile.

La mise en évidence d'une modification du phénotype, simultanément sur les différentes tiges d'une même plante, nous a conduit à rechercher également si une liaison pouvait être faite entre cette modification phénotypique et la morphogenèse.

Matériel et méthodes

— *Le matériel végétal* nous a été fourni par PICARD de la Station d'Amélioration des Plantes de Dijon-Époisses, I.N.R.A.). Il s'agit d'une lignée de printemps, Ad 23, en 9e génération de rétrocroisement sur le cytoplasme « Cambridge 447 ». Cette lignée a été sélectionnée par BERTHELEM à la Station I.N.R.A de Rennes.

— *Semis*. Les graines, stérilisées 10 minutes dans l'eau de Javel diluée de moitié, sont mises à germer le 20 février 1976 dans de la vermiculite. 150 jeunes plantes sont repiquées en serre le 1er mars avec un espacement de 0,40 m dans la ligne et de 0,60 m entre les lignes, permettant le passage et facilitant l'émission de tiges secondaires («talles »).

Notations

L'ordre d'apparition des tiges et leur localisation sur la plante sont repérés dès leur apparition. A la floraison, les plantes sont examinées et le phénotype noté pour les tiges fleuries. L'observation est poursuivie pour chaque tige jusqu'à la fin de la végétation; chaque plante est notée à peu près chaque semaine, soit tous les 4 à 6 nœuds foliaires.

Phénotypes

Le stade d'observation choisi est celui de la fleur parvenue à maturité mais dont les pétales sont encore enroulés. Trois classes phénotypiques sont déterminées par l'aspect du pollen et des étamines :

— le phénotype stérile « S » : absence totale de pollen visible à l'œil nu, étamines recroquevillées brun-gris « sèches »;
— le phénotype fertile « F » : pollen blanc abondant, étamines souvent noires;
— le phénotype intermédiaire « I » : fleurs présentant un peu de pollen blanc, étamines noires ou pollen gris-jaune plus ou moins abondant, c'est-à-dire tout ce qui est ni stérile ni fertile.

Mesures annexes

En fin de végétation, sur certaines plantes ayant présenté une modification phénotypique (voir résultats), nous avons noté le nombre de folioles à chaque nœud foliaire.

Résultats

1. — *Hétérogénéité du 9e rétrocroisement*

L'examen du phénotype pollinique de 146 plantes Ad 23 fait apparaître une hétérogénéité à deux niveaux, entre les individus et à l'intérieur des individus, délimitant ainsi 2 groupes de plantes (tabl. 1) :

— celles dont le phénotype reste inchangé tout le long de la floraison : S, I ou F;

— celles dont le phénotype évolue au cours de la floraison de stérile à intermédiaire, ces plantes sont appelées « SVI » (pour Stérile Vers Intermédiaire).

TABLEAU I

Plantes observées dans le semis en serre de 146 individus Ad 23/447 (9e rétrocroisement)

Phénotypes polliniques	S	I	F	SVI	Total
Effectif.	53	27	4	62	146

Les phénotypes S, stériles; I, intermédiaires; F, fertiles et SVI, stériles vers intermédiaires, sont explicités dans le texte (Méthodes).

2. — *Modalités du changement phénotypique. Phénomène SVI*

a) Ce changement de phénotype a lieu quasi simultanément sur toutes les tiges d'une même plante. C'est-à-dire qu'une plante notée S sera, au passage suivant, 4 à 6 nœuds plus haut, notée I pour toutes ses tiges. Une tige de Féverole ne peut donc plus être considérée comme phénotypiquement homogène.

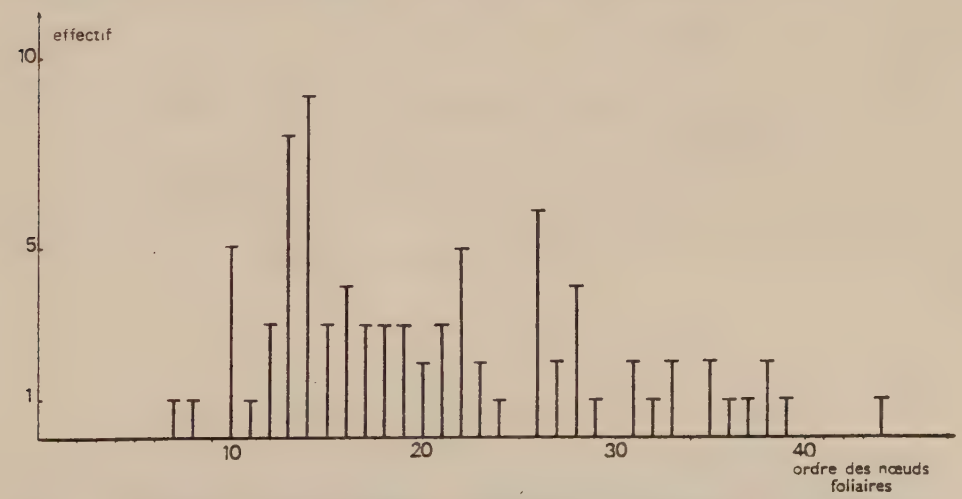


FIG. 1. — *Plantes SVI. Premier nœud où le phénotype I a été constaté sur la tige principale.*

b) Ce phénomène SVI peut avoir lieu n'importe quand pendant la vie de la plante. C'est ce qu'illustre la figure 1. Chaque plante présentant ce phénomène apparaît de ce point de vue comme originale.

c) Ce changement phénotypique est irréversible, nous n'avons jamais constaté de passage I vers S.

3. — *Phénomène SVI et morphogenèse*

Nous avons recherché un paramètre qui pouvait traduire l'évolution de la plante au cours de sa morphogenèse. Le nombre de folioles par nœud évolue régulièrement, pendant la croissance, de 2 à 6 et parfois 7. Nous avons représenté dans la figure 2 cette évolution pour 3 plantes et nous avons fait figurer pour chacune des tiges le moment approximatif où s'est produit le phénomène SVI.

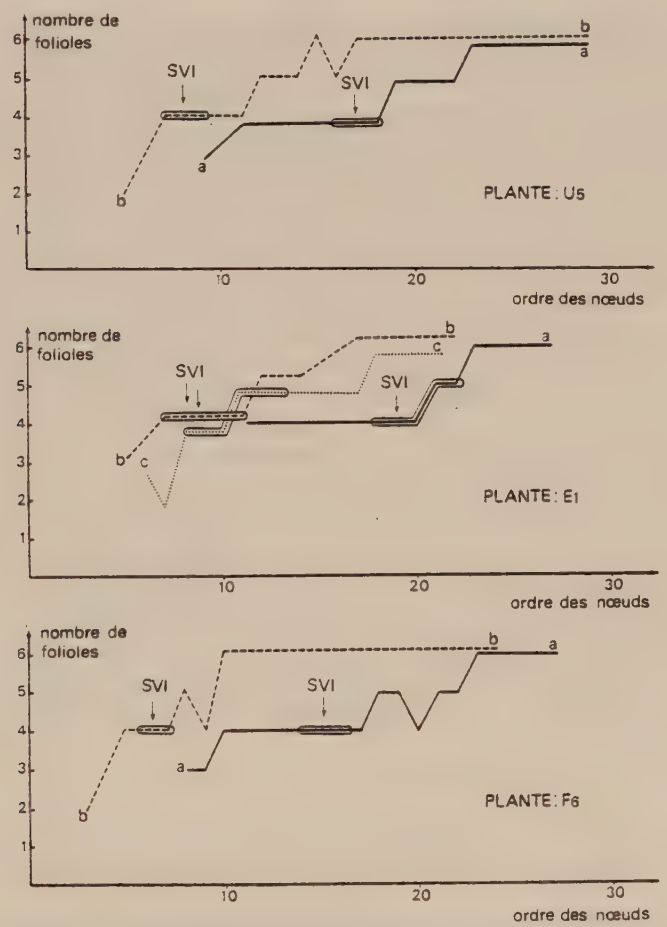


FIG. 2. — *Phénomène SVI et morphogenèse. Localisation approximative du phénomène sur 3 plantes.* La tige principale est appelée « a », la tige issue du nœud le plus basal « b » et celle issue du nœud immédiatement supérieur « c ».

On peut constater que c'est au même stade de la morphogenèse que se situe la modification phénotypique pour les différentes tiges d'une même plante :

— au stade 4 folioles/nœud pour les plantes U5 et F6;

— entre les stades 4 et 5 pour la plante E1.

Nous n'avons pu faire ces observations que sur les plantes SVI qui portaient encore l'essentiel de leurs feuilles en fin de végétation. L'effectif des plantes qui pouvaient être prises en considération était donc réduit mais sur d'autres plantes SVI (non représentées) c'est à d'autres stades (5, 6) que s'est produit le phénomène, mais toujours simultanément pour les différentes tiges d'une même plante.

Interprétation - Discussion

1. — *La réversion somatique*

Les observations rapportées mettent en évidence une modalité nouvelle du passage sur le même individu du phénotype stérile à un phénotype plus fertile (intermédiaire). Divers auteurs (Bond *et al.*, 1966*a*; Berthelem, 1970) décrivent des plantes « talles-stériles », plantes stériles qui présentent à leur base une ou plusieurs ramifications fertiles. La modification phénotypique se fait ici le long d'une même tige et de façon plus graduelle (passage de S à I). Cette discontinuité est peut-être le reflet du mode de notation en 3 classes (un comptage en microscopie nous aurait peut-être indiqué une évolution continue). D'autre part, cette modification concerne toute la plante (dans quelques cas le changement de phénotype a été constaté avec un décalage d'une semaine entre les tiges d'un même individu) mais à des moments différents pour chacune des plantes (fig. 1).

Ce phénomène SVI est à rapprocher des observations de Bond qui signale la quasi-fertilité des féveroles mâle-stériles géniques en fin de végétation. On peut alors interpréter le phénomène SVI comme l'expression atténuée de l'allèle de maintien dans des conditions trophiques données (vieillissement). On distingue alors nettement dans ce cas cette modalité de celle des plantes « talle-stériles ».

L'hypothèse de travail que nous avons choisie (Thiellement, 1977) en fonction des particularités du matériel (réversion somatique, instabilité phénotypique et restauration permanente) peut rendre compte de ces deux modalités. On considère que les cellules des plantes mâle-stériles cytoplasmiques instables possèdent deux types de cytoplasmones en proportions variables selon les individus (les uns « compatibles » conduisant à la fertilité pollinique, les autres « incompatibles » conduisant à la stérilité mâle). Ces proportions peuvent se modifier soit graduellement et de la même façon sur toute la plante (plantes SVI) soit brusquement par ségrégation somatique à l'origine d'une tige (plantes « talle-stériles »).

2. — *L'hétérogénéité du 9e rétrocroisement*

Cette « lignée » mâle-stérile surprend, non seulement par la présence de 4 plantes fertiles, mais aussi par l'étendue de la variation du phénotype pollinique (tabl. 1, fig. 1).

Cette variabilité ne peut raisonnablement être attribuée à une ségrégation de facteurs nucléaires. Il s'agit en effet de la 9e génération de rétrocroisement et à chacune de ces générations, on a pratiqué un tri et les fertiles ont été éliminés.

Néanmoins il n'est pas impossible qu'il s'agisse de l'expression de gènes mineurs récessifs de restauration amenés à l'état homozygote. Cela implique que ces gènes soient nombreux et plus ou moins liés à des caractères agronomiques intéressants.

Le fait le plus marquant est l'existence de 62 plantes dont le phénotype varie au cours de la floraison (plantes SVI). Si le phénomène reflète une modification dans le matériel héréditaire, l'hypothèse des gènes restaurateurs récessifs est alors difficilement conciliable avec l'effectif des plantes SVI et les modalités du phénomène.

La simultanéité du phénomène SVI sur les différentes tiges d'une même plante rend peu convaincante l'hypothèse d'une mutation cytoplasmique due ou non à un gène nucléaire « mutateur » (CLÉMENT, 1975; TILNEY-BASSET, 1975) ou celle de la perte d'un facteur ou l'intégration d'un épisome (LAUGHNAN et GABAY, 1975). Par contre, l'étendue de cette hétérogénéité conforte l'hypothèse de travail d'hétérogénéité cytoplasmique sur laquelle s'exerce la pression sélective du noyau, modulée par les conditions de milieu et les mécanismes de répression /dérepression au cours de la morphogenèse.

La figure 2 montre que l'on peut faire une liaison entre le phénomène SVI, le temps et un stade donné de la morphogenèse. Mais la variété des stades morphogénétiques ainsi définis où se produit le phénomène rend difficile cette voie comme démarche explicative.

Une interprétation qui pourrait être faite de cette variabilité phénotypique est celle de l'influence des conditions de serre, notamment des températures élevées durant les mois de mai et juin 1976, sur l'expression de la fertilité pollinique (MARREWIJCK, 1969; SINGH, 1974, 1975). D'autant que DUC (1976) rapporte que le même matériel (9e rétrocroisement d'Ad 23 sur le cytoplasme 447) n'a présenté ni la même fréquence ni la même intensité de retour à la fertilité dans des conditions de champs.

Pour tester ce type d'explication (expression phénotypique modifiée par la température ou par le vieillissement) vis-à-vis d'une modification du matériel héréditaire, nous nous proposons d'étudier l'hérédité de ces plantes de phénotypes différents.

Conclusion

L'observation du phénotype pollinique tout au long de la floraison d'une lignée mâle-stérile de Féverole met en évidence :

— une nouvelle particularité de la réversion somatique chez cette espèce, le phénomène SVI;
— une grande hétérogénéité entre les individus.

Ces deux types de résultats sont compatibles avec l'hypothèse d'une hétérogénéité cytoplasmique mais peuvent s'expliquer par une expression différente de la fertilité pollinique due à des conditions trophiques ou climatiques particulières.

Reçu pour publication en juin 1977.

Remerciements

Ce travail a été financé en partie par la section « Légumineuses à grosses graines » de l'Association des Créateurs de Variétés Fourragères (A.C.V.F.).

Summary

Cytoplasmic male-sterility in Vicia faba *L.*
II. — Phenotypic heterogeneity of a male-sterile line

A male-sterile line of field bean has been observed throughout its flowering period in a green-house. The phenotype (S for sterile, F for fertile, I for semi-fertile or semi-sterile) is noted approximatly every week for each tiller. A large number of plants (62 over 146) has presented a phenotypic modification (from S to I) simultaneously for all the tillers of one plant but for each plant at different times. This phenomenon, called « SVI » is irreversible and may be correlated for each plant independently at the same morphogenetic stage on the different tillers.

The large phenotypic heterogeneity which is observed (S plants, I plants, F plants, SVI plants) is compatible with the working hypothesis of a cytoplasmic heterogeneity. Nevertheless, it may be caused by some modification of the expression of pollen fertility, by the ageing of the plants or by the green-house conditions.

Références bibliographiques

BERTHELEM P., 1970. Rapport d'activité de la Station d'Amélioration des Plantes de Rennes, I.N.R.A., 1968-1970.

BERTHELEM P. et LE GUEN J., 1974. Rapport d'activité de la Station d'Amélioration des Plantes de Rennes, I.N.R.A., 1971-1974.

BOND D., A. (non publié, communication à A. BERVILLÉ).

BOND D., A., FYFE J., L. et TOYNBEE-CLARKE G., 1966. Male sterility in field beans, *a*) III. — Male sterility with a cytoplasmic type of inheritance. *J. agric. Sci.*, **66**, 359-367.
b) IV. — Use of cytoplasmic male-sterility in production of F_1 hybrids and their performances in trials. *J. agric. Sci.*, **66**, 369-377.

CLEMENT W. M., 1975. Plasmon mutations in cytoplasmic male-sterile pearl millet, *Pennisetum thyphoides*. *Genetics*, **79**, 583-588.

DUC G., 1976. Étude sur l'instabilité phénotypique de la stérilité mâle cytoplasmique chez la Féverole (*Vicia faba* L.). *Mémoire de fin d'études E.N.S.A. Rennes.*

LAUGHNAN J. R. et GABAY S. J., 1975. An episomal basis for instability of S male-sterility in Maize and some implications for plant breeding. in « *Genetics and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts* » edited by BIRKY C. W. *et al.*, Ohio State University.

MARREWIJCK G. A. M., VAN, 1969. Cytoplasmic male-sterility in *Petunia*. I. Restoration of fertility with special reference to the influence of environment. *Euphytica*, **18**, 1-20.

SINGH I. S., 1974. Genetic analysis of pollen fertility in two lines of *Petunia*. *Ann. Amélior. Plantes*, **24** (2), 159-167.

SINGH I. S., 1975. Effets de la température et du niveau floral sur la fertilité pollinique chez le *Petunia*. *Ann. Amélior. Plantes*, **25** (4), 365-370.

THIELLEMENT H., 1977. La stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* L. I. — Historique et hypothèses. *Ann. Amélior. Plantes*, **27** (2), 203-209.

TILNEY-BASSETT R. A. E., 1975. Genetics of variegated plants. in « *Genetics and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts* » edited by BIRKY C. W. *et al.*, Ohio State University.

Ann. Amélior. Plantes, 1977, **27** (5), 555-562.

La stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* L.

III. — Hérédité des phénotypes polliniques

H. THIELLEMENT

Laboratoire d'Amélioration des Plantes,
Université de Paris-Sud, Bât. 360,
91405 Orsay-Cedex

Résumé

Une lignée mâle-stérile cytoplasmique de Féverole présente une hétérogénéité remarquable quant au phénotype pollinique. Nous avons analysé les descendances des plantes de phénotypes différents : stériles, fertiles, intermédiaires et plantes SVI, c'est-à-dire à secteurs de phénotype stérile (descendances « pré ») et à secteurs de phénotype intermédiaire (descendances « post »). Les proportions différentes des différents phénotypes dans ces descendances met en évidence le caractère héréditaire des modifications phénotypiques observées. La descendance est globalement plus fertile que la lignée mère et seules les plantes mères S ont de nombreux descendants stériles. Les modalités de cette hérédité complexe sont discutées dans le cadre de l'hypothèse d'une hétérogénéité cytoplasmique.

Introduction

La compréhension des mécanismes en jeu dans la stérilité mâle cytoplasmique chez la Féverole pourrait aboutir à une solution du problème agronomique qu'elle pose (PICARD, 1975). Ses particularités (instabilité phénotypique, réversion somatique, restauration permanente) et leurs interprétations ont été décrites par ailleurs (BOND *et al.*, 1966; BERTHELEM, 1970; THIELLEMENT, 1977 *a*). Une première étude d'une lignée mâle-stérile cytoplasmique en serre a révélé une hétérogénéité phénotypique considérable (THIELLEMENT, 1977 *b*). Cette hétérogénéité et les modifications phénotypiques décrites résultent-elles de l'influence du milieu ou du vieillissement sur l'expression de la fertilité pollinique ou reflètent-elles des modifications dans le matériel héréditaire ? Pour trancher entre ces deux groupes d'hypothèses, nous rapportons ici les données obtenues par l'analyse des descendances de ce matériel phénotypiquement hétérogène.

Matériel et méthodes

Il s'agit des descendances de la lignée de printemps Ad 23, sélectionnée à la Station I.N.R.A. de Rennes par BERTHELEM, en 9e génération de rétrocroisement (BC9) sur le cytoplasme mâle-stérile anglais « Cambridge 447 » (BOND *et al.*, 1966). Le BC9 nous a été fourni par PICARD de la Station de Dijon-Époisses.

L'observation de ce BC 9 (THIELLEMENT, 1977*b*) permettait de distinguer 4 types de plantes pour le phénotype pollinique : des plantes fertiles « F », stériles « S » ou intermédiaires « I » de la première fleur à la fin de la végétation, ainsi que des plantes dites « SVI » dont le phénotype se modifiait en cours de floraison, passant du phénotype S au phénotype I simultanément pour toutes les tiges d'une même plante.

Nous avons regroupé les descendances en fonction du phénotype des plantes mères pollinisées librement, en effet :

— toutes ces plantes ont été pollinisées par le même nuage de pollen génétiquement homogène (BC9 vers BC10);
— en ce qui concerne la restauration de la fertilité, les auteurs indiquent (BOND *et al.*, 1966; BERTHELEM, 1970; PICARD, 1972; BERTHELEM et LE GUEN, 1974) que le pollen formé sur des plantes ou des secteurs fertiles, d'une descendance mâle-stérile par mainteneur, se comporte en croisement comme mainteneur de stérilité;
— enfin, ces plantes étant les seules féveroles dans la serre et alentour, toute contamination par du pollen étranger était exclue.

Les gousses issues de pollinisation libre sont prélevées individuellement. On les repère par le numéro de la plante, le numéro de la tige et le numéro d'ordre du nœud foliaire. Les graines semées individuellement en multipots le 1er décembre 1976 sont repiquées en serre le 12 décembre avec un espacement de 0,40 m dans la ligne et de 0,60 m entre les lignes.

La détermination phénotypique et les méthodes d'observation ont été décrites précédemment (THIELLEMENT, 1977*b*).

Résultats

Les descendances sont regroupées en fonction du phénotype pollinique des plantes mères : descendances des plantes F, des plantes I, des plantes S.

Les descendances des plantes SVI sont :

— soit issues de secteurs de phénotype S, on les appelle descendances « pré »;
— soit issues de secteurs de phénotype I, on les appelle descendances « post ».

1. — *Descendances des plantes F*

Les deux descendances observées (14 plantes et 10 plantes) sont entièrement fertiles.

2. — *Descendances des plantes I* (tabl. I)

— Il n'y a pas de stériles (colonne S) dans ces descendances.

— Une nouvelle classe phénotypique (colonne IVF) apparaît dans ces descendances. Il s'agit de plantes dont le phénotype s'est modifié en cours de végétation : d'abord notées I, elles sont, au passage suivant, notées F et ce pour toutes

TABLEAU I

Descendances des plantes « I » (intermédiaire)

Phénotypes / Plantes mères	S	SVI	I	IVF	F	X	Total
E2			8		2		10
F3		2	9	2	30	1 F/I	44
G5		2	4		4		10
N5			5	2			7
Q1		2	2				4
R4		3	2		8	1 I/F 1 SVI/F	15
Effectifs	0	9	30	4	44	3	90
Fréquences . . .	0,00	0,10	0,33	0,04	0,49	0,03	

En fonction de chaque plante mère de phénotype « I » (1re colonne), on a regroupé les descendants selon leur phénotype pollinique « S », stérile; « SVI », stérile vers intermédiaire; « I », intermédiaire; « IVF » intermédiaire vers fertile; « F », fertile. Dans la colonne X on a placé les plantes dont le phénotype n'est pas le même pour toutes les tiges. Ainsi I/F signifie que la tige principale est intermédiaire et une ou plusieurs ramifications secondaires fertiles.

les tiges d'une plante simultanément. Ces plantes IVF n'ont été observées que dans ces descendances.

— On observe (colonne F) près de 50 p. 100 de plantes fertiles.

— Dans la colonne X sont répertoriées les plantes dont le phénotype n'est pas identique pour toutes les tiges. Par exemple, I/F signifie que la tige principale est de phénotype intermédiaire alors que une ou plusieurs tiges secondaires sont de phénotype fertile.

— Les proportions relatives des différents types de descendants sont indiquées sur la dernière ligne du tableau.

3. — *Descendances des plantes SVI* (tabl. 2)

— Il n'est apparu qu'une plante stérile dans ces descendances, elle est issue d'un secteur « pré ».

— Les autres classes phénotypiques (SVI, I, F) sont représentées aussi bien dans les descendances « pré » que dans les descendances « post » mais pas dans les mêmes proportions. Ce fait est illustré par le tableau 3 qui regroupe les 4 plantes mères où existent des descendances issues de pré et de post.

— Quand on considère globalement toutes les descendances issues des plantes SVI et celles des plantes I, les différents phénotypes sont dans les mêmes proportions (dernières lignes des tabl. 1 et 2), mais c'est le fait de la superposition des descendances issues de pré et de post.

TABLEAU 2

Descendances des plantes « SVI » (stérile vers intermédiaire)

Plantes mères \ Phénotypes		S	SVI	I	IVF	F	X	Total
A4	pré		1			1		3
	post					1		
C2	pré	1	3	11		9		46
	post			3		19		
C3	pré		1	3				8
	post		1	3				
D6	post			5		10		15
E1	pré		1	4		8	1 SVI/F	14
F1	post			6		7	1 SVI/ F	14
G6	pré		1	3		3		10
	post		1			2		
14	post		2	2				4
L3	post					6	1 I/F	7
O2	post		1	4			1 I/F	7
							1 F/I	
Pré	Effectif	1	7	21	0	21	1	51
	Fréquence	0,02	0,14	0,41	0,00	0,41	0,02	
Post	Effectif	0	5	23	0	45	4	77
	Fréquence	0,00	0,06	0,30	0,00	0,58	0,05	
Total	Effectif	1	12	44	0	66	5	128
	Fréquence	0,01	0,09	0,34	0,00	0,52	0,04	

Dans ces descendances, on a distingué celles issues de secteurs phénotypiquement stérile (descendances « pré ») de celles issues de secteurs phénotypiquement intermédiaires (descendances « post »). Les phénotypes sont décrits dans la légende du tableau I.

TABLEAU 3

Descendances des plantes « SVI » A_4, C_2, C_3 et G_8

Phénotypes	S	SVI + I	F
« pré »	1	23	13
« post »	0	8	22

Ces quatre plantes présentent à la fois des descendances « pré » (issues de secteurs de phénotype stérile) et « post » (issues de secteurs de phénotype intermédiaire), nous avons comparé les effectifs de leurs descendances. Le test du χ^2 effectué sur les 2 dernières colonnes de droite fait apparaître une différence significative au seuil de 0,01.

4. — *Descendances des plantes S* (tabl. 4)

— C'est dans les descendances des plantes S que l'on retrouve le plus de plantes stériles : 62 p. 100.

— On observe néanmoins une proportion importante de plantes fertiles : 18 p. 100.

— Dans la desdendance de H6, on note (colonne X) une plante « talle-stérile ».

TABLEAU 4

Descendances des plantes « S » (stérile)

Phénotypes / Plantes mères	S	SVI	I	IVF	F	X	Total
B1	1	1					2
D1	8	1	1		1		11
E6	2				2		4
F2	2	1			4		7
H6	11	2	1			1 S/F	15
K4	3				1		4
W5	1						1
N2		1					1
Effectif	28	6	2		8	1	45
Fréquence . . .	0,62	0,13	0,04	0,00	0,18	0,02	

Les phénotypes sont décrits dans la légende du tableau 1.

Interprétation - Discussion

Les proportions des différents phénotypes dans les descendances des plantes F, I et S (tabl. 1 et 4) et dans les descendances des secteurs pré et post des plantes SVI (tabl. 2 et 3) font apparaître que les variations phénotypiques observées chez les plantes mères sont le reflet de modifications dans le matériel héréditaire. On remarque que dans ce cas, paradoxalement, le déterminisme cytoplasmique de la stérilité mâle n'entraîne pas une hérédité maternelle stricte, sauf dans le cas des plantes fertiles puisque, pour les autres catégories, les descendants n'ont pas tous le phénotype maternel.

La discussion faite dans une note précédente (THIELLEMENT, 1977*b*), sur la validité des différentes hypothèses explicatives vis-à-vis des observations, et notamment du phénomène SVI, prend donc là tout son sens. Mais les modalités de cette hérédité apportent de nouvelles informations.

Il ne s'agit pas de deux états cellulaires (fertile/stérile; virosé/guéri) présents simultanément car, dans ce cas, même si globalement au niveau du pollen, on pouvait constater des phénotypes intermédiaires ou variables, on aurait dû trouver dans la descendance de ces plantes mosaïques (les plantes I dans cette hypothèse) des individus stériles. L'ensemble de ces résultats peut s'interpréter selon l'hypothèse de travail précédemment émise (THIELLEMENT, 1977*a*) : dans une lignée mâle-stérile cytoplasmique instable, les cellules des plantes possèdent deux types de cytoplasmones en proportions variables selon les individus. Un type « compatible » qui accompagne la fertilité pollinique et un type « incompatible » conduisant à l'avortement du pollen.

La descendance des plantes « I » (tabl. I) se compose d'individus où les proportions sont restées les mêmes que chez les plantes mères (descendants I) et d'individus où ces proportions se sont modifiées. Cette modification s'est faite soit précocement, dès l'ovule ou avant la floraison (descendants F) soit plus tardivement (descendants IVF). Les descendants SVI proviendraient d'ovules où la proportion de cytoplasmones compatibles était inférieure à celle de la plante mère (ségrégations somatiques lors de la gamétogenèse femelle).

La descendance des plantes « SVI » (tabl. 2) est identique en proportions à celle des plantes I (dernières lignes des tabl. 1 et 2), mais ce total recouvre deux types de descendances, pré et post, qui sont, elles, différentes (tabl. 3). Il s'ensuit que si les secteurs pré fournissent plus de plantes I, les secteurs post (phénotypiquement I) donnent moins de plantes I et SVI et plus de plantes F que les plantes mères I.

Ces faits peuvent s'interpréter si l'on considère que dans l'ovule à l'origine de la plante SVI, il y a moins de cytoplasmones compatibles qu'à l'origine d'une plante I, et ses premières fleurs sont phénotypiquement S. Mais en cours de végétation, l'évolution se fait au profit des cytoplasmones compatibles (phénomène SVI) et se poursuit au-delà des proportions des plantes I en moyenne. C'est cette évolution qui est reflétée par les proportions de descendants.

Les descendances des plantes « S » (tabl. 4) ne sont pas nombreuses par plante et l'examen de certaines d'entre elles, d'effectif petit, peut sembler surprenant (2S/2F; 3 S/1F). Par contre, si l'on considère les descendances plus importantes des plantes D1 et H6, on observe presque tous les phénotypes, mais le mode est phénotype stérile.

On pourrait néanmoins suggérer que parmi les 4 plantes fertiles du BC 9 (THIELLEMENT, 1977*b*), l'une portait un allèle de restauration (mutation rf vers Rf, en cours de vérification). Mais la faible probabilité de cet événement entraîne que au plus 1/8e du pollen circulant était restaurateur. Dans ce cas, la proportion de descendants F est accrue mais cela ne modifie pas l'allure générale des résultats.

Ces observations pourraient également s'interpréter en ne faisant intervenir qu'un seul élément cytoplasmique qui déterminerait, en quantités importantes, l'avortement du pollen. Les modifications phénotypiques reflétant les modifications quantitatives de cet élément et sa disparition correspondant au retour à la fertilité. Nous nous sommes néanmoins attaché à l'hypothèse précédente pour deux types de raison :

1° Si la règle générale est l'évolution irréversible de stérile à fertile, on connaît des cas de passage inverse. Ainsi HOFMANN (1972) et LE GUEN (communication personnelle) signalent l'apparition d'un rameau stérile sur une tige fertile d'une plante « talle-fertile ». On peut remarquer dans nos résultats (tabl. 5), dans la descendance « post » de la plante O_2, une plante dont la tige principale est « F » et qui a fourni des ramifications « I ». Si l'état « F » correspond à la disparition du cytoplasmone responsable de l'avortement du pollen, on interpète mal ces cas.

2° Sans qu'aucune démonstration définitive n'ait été apportée, l'hypothèse du support mitochondrial de la stérilité mâle cytoplasmique semble de plus en plus étayée. Dans cette optique, il semble logique de faire intervenir, dans ce cas d'instabilité, des chondriomes compatibles et incompatibles.

L'interprétation proposée d'hétérogénéité cytoplasmique sous-entend une dérive de cytoplasmones du fait de ségrégations somatiques. Il faut, pour rendre compte du fait que l'on aille presque toujours dans le sens stérile vers fertile, faire intervenir une pression sélective. Le génome nucléaire est vraisemblablement un agent sélectif puisque le taux de retour à la fertilité est fonction du mainteneur (BERTHELEM, 1970; BERTHELEM et LE GUEN, 1974) et aussi pour rendre compte de la restauration permanente. Dans cette hypothèse, l'allèle de restauration élimine en une génération les cytoplasmones incompatibles. Il est de surcroît probable que les conditions de milieu interviennent.

Conclusion

L'analyse des descendances maternelles montre le caractère héréditaire de l'hétérogénéité phénotypique observée dans une lignée mâle-stérile cytoplasmique de Féverole. L'hérédité des phénotypes polliniques peut s'interpréter par une hétérogénéité cytoplasmique.

Seules les plantes S ont des descendants stériles. Il est trop tôt pour affirmer qu'une sélection généalogique maternelle (THIELLEMENT, 1977*a*), une fois réalisée la sélection pour le mainteneur, permettra d'obtenir un cytoplasme mâle-stérile stable. En effet cette méthode ne peut se révéler efficace que si le phénomène qui engendre cette hétérogénéité est rare. D'autre part, même dans la descendance des plantes S, on observe 18 p. 100 de fertiles.

Peut-être conviendrait-il parallèlement de rechercher de nouveaux cytoplasmes. Une manière de l'obtenir pourrait être la mutagenèse sur lignées mâle-stériles et le crible une restauration non permanente.

Reçu pour publication en juin 1977.

Remerciements

Ce travail a été en partie financé par l'Association des Établissements Multiplicateurs de Semences de Plantes Légumineuses à Grosses Graines (A.M.S.O.L. Protéagineux).

Summary

Cytoplasmic male-sterility in Vicia faba *L.*
III. — Heredity of different phenotypes

A male-sterile line (9th back-cross) of field bean shows a great heterogeneity concerning pollen fertility. Offsprings of plants of different phenotypes (sterile S, fertile F, semi-sterile I and modifying phenotypes from sterile to semi-sterile SVI plants) are analysed. The difference in the proportions of the phenotypes in the offsprings indicates that the phenotypical modifications observed in mother plants are the reflect of some changes in the hereditary material.

On the SVI plants, the offsprings from the phenotypically « I » sectors, called « post », are more often fertile and less often semi-sterile and SVI than the offsprings from the phenotypically « S » sectors, called « pre ». Furthermore, only one S plant appears in the offsprings of SVI plants and it is originated from a « pre » sector.

All the offsprings of F plants analysed are completely fertile.

Offsprings of S plants are mainly steriles (62 p. 100), nevertheless they give 18 p. 100 of fertiles.

In the offsprings of I plants, no sterile plants were found, but 49 p. 100 of fertiles. A new modifying phenotype appears in those offsprings, from semisterile to fertile, called " IVF ". Like in the SVI plants, this modification takes place simultaneously for all the tillers of one plant.

The working hypothesis, previously formulated, of two kinds of plasmons, one leading to pollen fertility, the other to pollen sterility, in different proportions in each plant, may explain the results. The tendancy to change nearly always to a more fertile state indicate a selective pressure, which can be attribute to the nuclear genome.

Références bibliographiques

BERTHELEM P., 1970. *Rapport d'Activité de la Station d'Amélioration des Plantes de Rennes* I.N.R.A., 1968-1970.

BERTHELEM P., et LE GUEN J., 1974. *Rapport d'Activité de la Station d'Amélioration des Plantes de Rennes*, I.N.R.A., 1971-1974.

BOND D., A., FYFE J. L. et TOYNBEE-CLARKE G., 1966. Male-sterility in field beans. III. — Male-sterility with a cytoplasmic type of inheritance. *J. agric. Sci.*, **66**, 359-368.

HOFMANN J. P., 1972. *Contribution à l'étude de la stérilité mâle de la Féverole.* D.E.A. Université de Paris-Sud-Orsay, 30 p.

PICARD J., 1972. *Rapport d'Activité de la Station d'Amélioration des Plantes de Dijon*, I.N.R.A., 1968-1972.

PICARD J., 1975. Les protéagineux d'hiver : la féverole et le pois. *Fourrages Actual.*, **11**, 3-11.

THIELLEMENT H., 1977*a*. La stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* L. I. — Historique et hypothèses. *Ann. Amélior. Plantes*, **27** (2), 203-209.

THIELLEMENT H., 1977*b*. La stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* L. II. — Hétérogénéité phénotypique d'une lignée mâle-stérile. *Ann. Amélior. Plantes*, **27**, (5), 547-553.

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 287 (3 juillet 1978) Série D — 29

GÉNÉTIQUE VÉGÉTALE. — *Sur la réversion somatique de la stérilité mâle nucléo-cytoplasmique chez* Vicia faba *L.* Note (*) de **Hervé Thiellement** (1), présentée par M. André Cauderon.

Les plantes mâle-stériles (androstérilité à déterminisme nucléocytoplasmique) de Féverole peuvent présenter des modifications somatiques du phénotype pollinique. Ces modifications, progressives ou subites, étaient considérées jusqu'ici comme unidirectionnelles, du plus stérile au plus fertile. Nous rapportons ici l'observation de plantes qui échappent à cette règle.

Male-sterile plants (the male sterility is determined by an interaction between nuclear and cytoplasmic factors) of field bean can present somatic modifications of the pollen's phenotype. These modifications, gradual or sudden, are known to be unidirectional, from more sterile to more fertile. We present here observations of plants which are exceptions to this rule.

INTRODUCTION. — La stérilité mâle nucléo-cytoplasmique chez *Vicia faba* L. présente trois particularités :

1° *L'« instabilité »* (*fig.* 1 *a*). — Dans la descendance du croisement entre une lignée mâle-stérile cytoplasmique et une lignée mâle-fertile qui maintient la stérilité (parent mainteneur), il apparaît des plantes fertiles. Nous utiliserons dans cette Note, « stérile » pour mâle-stérile et « fertile » pour mâle fertile.

2° *La « réversion somatique »*. — Dans ces mêmes descendances, on trouve des plantes présentant des secteurs de phénotype différent.

Le pollen de ces plantes ou de ces secteurs fertiles, apporté sur une plante stérile, fournit une descendance phénotypiquement identique à celle d'un pollen de mainteneur. Il ne s'agit donc pas de restauration de la fertilité par suite d'une mutation d'un gène nucléaire ($r_f \rightarrow R_f$).

3° *La « restauration permanente »* (*fig.* 1 *b*). — On ne retrouve plus de plantes stériles dans la descendance F_2 obtenue par autofécondation de l'hybride entre un mâle-stérile cytoplasmique et un restaurateur de fertilité. On y retrouve, par contre, des plantes dont le pollen est mainteneur (donc de constitution génétique r_f/r_f).

Ces données, détaillées et interprétées par ailleurs [(2) à (4)], laissent présumer une modification cytoplasmique.

Nous rapportons ici quelques observations relatives à la réversion somatique. Dès la découverte du cytoplasme « 447 » qui induit la stérilité mâle, Bond et coll. (2) signalent des plantes « tiller-sterile » (talle-stériles). Il s'agit d'individus présentant à la fois des ramifications fertiles et stériles. Nous distinguerons deux modalités de la réversion somatique.

(*a*) *Une modalité progressive* que nous avons constatée en observant le phénotype tout au long de la floraison, et en définissant trois phénotypes polliniques : « F » pour mâle-fertile; « S » pour mâle stérile et « I » (intermédiaire) pour toute observation n'entrant dans aucune des deux catégories précédentes, semi-stérile ou semi-fertile. Les plantes « SVI » (pour Stérile vers Intermédiaire) présentent d'abord le phénotype « S » puis le phénotype « I ». Cette modification phénotypique a lieu simultanément sur les différentes tiges d'un même individu mais à des moments différents pour chacune des plantes « SVI » (5). Cette différence reflète une modification du matériel héréditaire : la descendance des secteurs de phénotype « I » est globalement plus fertile que celle des secteurs de phénotype « S » des mêmes plantes (6).

Cette modalité traduit un phénomène qui concerne les bourgeons terminaux.

(*b*) *Une modalité subite* qui est celle des plantes « talle-stériles », où l'on peut observer simultanément des tiges de phénotype différent sur le même individu. Une plante « talle-stérile » est notée « S/F » (« S » désignant le phénotype de la tige principale, « F » celui de une ou plusieurs tiges secondaires).

Cette modalité traduit un phénomène qui concerne les bourgeons axillaires.

Les modifications subites (S/F, I/F) sont beaucoup moins fréquentes que les modifications progressives (SVI, IVF) et peuvent se superposer à ces dernières (plantes SVI/F par exemple). Progressives ou subites, ces modifications phénotypiques sont jusqu'alors apparues comme unidirectionnelles, de la stérilité vers la fertilité pollinique. Deux observations isolées [(7), (8)] montrent pourtant l'apparition d'une ramification stérile sur une tige fertile d'une plante « talle-stérile » (deux plantes S/F/S). Nous rapportons ici les données recueillies sur six plantes présentant des modifications phénotypiques subites.

Matériel végétal. — 146 plantes de la lignée mâle-stérile de Féverole de printemps Ad_{23} [issues du 9e rétrocroisement sur le cytoplasme de Bond (2) « 447 »] ont été observées en serre à Orsay selon des méthodes déjà décrites (5). Deux plantes mâle-stériles, D 1 et K 4, ont fourni en fécondation libre (9), un certain nombre de plantes de phénotypes différents (voir *fig.* 2). Parmi ces dernières, trois plantes mères « S » (soulignées, dans la F_{10}), fécondées librement, ou croisées avec une plante sœur « F » ont donné les six plantes analysées où s'observent des modifications phénotypiques subites (encadrées, dans la F_{11}).

Il convient de souligner la relative rareté de ces plantes. Au cours de trois générations du même matériel Ad_{23}/447, nous en avons relevé 0 sur 146 dans le BC_9, 9 sur 263 dans la F_{10} et 7 sur 90 dans cette F_{11}.

Observations. — Les six plantes analysées sont schématisées dans les figures 3 à 8. Les différentes tiges sont représentées selon leur origine morphogénétique. Les phénotypes S, I ou F sont indiqués ainsi que l'ordre d'apparition des 5 ou 6 premières tiges.

Les plantes B_4 (*fig.* 3) « SVI/F » et N_3 (*fig.* 4) « I/F » montrent une évolution phénotypique conforme à l'ensemble des observations du phénomène, c'est-à-dire que l'on observe un passage vers la fertilité et ce, irréversiblement. Il n'apparaît pas de tiges I provenant de tiges F.

Par contre, les quatre autres plantes manifestent un sens inverse de modifications phénotypiques, du plus fertile au moins fertile, selon des modalités variées :

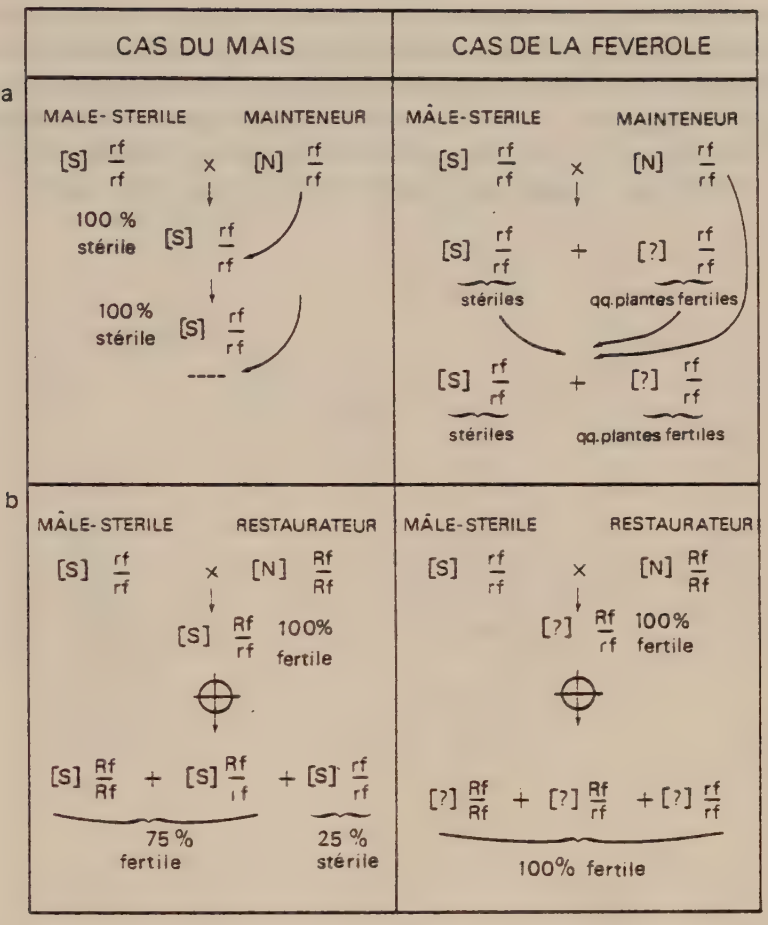
— des tiges I issues de tiges F pour les plantes L_3 et G_3 (*fig.* 5 et 6) plantes « F/I »;

— des tiges I issues de tiges F, mais aussi des tiges F issues de tiges I pour la plante G_4 (*fig.* 7), plante « F/I/F »;

Explication de la Planche

Fig. 1. — Les particularités de la stérilité mâle nucléo-cytoplasmique chez *Vicia faba*. Le cas de la Féverole est comparé à un cas « classique », celui d'un des cytoplasmes du Maïs. Le « cytotype » est indiqué entre crochet. La restauration de la fertilité est dûe à un gène dominant.

Fig. 2. — Généalogie en serre des six plantes étudiées, à partir du 9e rétrocroisement de la lignée Ad_{23} sur le cytoplasme mâle-stérile « 447 ». Les phénotypes des plantes sont symbolisés de la façon suivante : « S » : mâle-stérile; « F » : mâle-fertile; « I » : intermédiaire entre « S » et « F ». « SVI » désigne une plante qui a présenté une modification progressive du phénotype S au phénotype I. « I/F » définit une plante ou a eu lieu des modifications subites. I est le phénotype de la tige principale. F celui de une ou plusieurs tiges secondaires. Les plantes meres de la F_{10} (D 1-1, D 1-4 et K 4-3) sont soulignées et les plantes étudiées (F_{11}) sont encadrées.


CAS DU MAIS
CAS DE LA FEVEROLE
a
MALE-STERILE
MAINTENEUR
[S] rf/rf × [N] rf/rf
100 % stérile
[S] rf/rf
100 % stérile
[S] rf/rf

MÂLE-STERILE
MAINTENEUR
[S] rf/rf × [N] rf/rf
[S] rf/rf + [?] rf/rf
stériles
qq.plantes fertiles
[S] rf/rf + [?] rf/rf
stériles
qq.plantes fertiles
b
MÂLE-STERILE
RESTAURATEUR
[S] rf/rf × [N] Rf/Rf
[S] Rf/rf 100% fertile
[S] Rf/Rf + [S] Rf/rf + [S] rf/rf
75 % fertile
25 % stérile
MÂLE-STERILE
RESTAURATEUR
[S] rf/rf × [N] Rf/Rf
[?] Rf/rf 100% fertile
[?] Rf/Rf + [?] Rf/rf + [?] rf/rf
100% fertile

Fig. 1

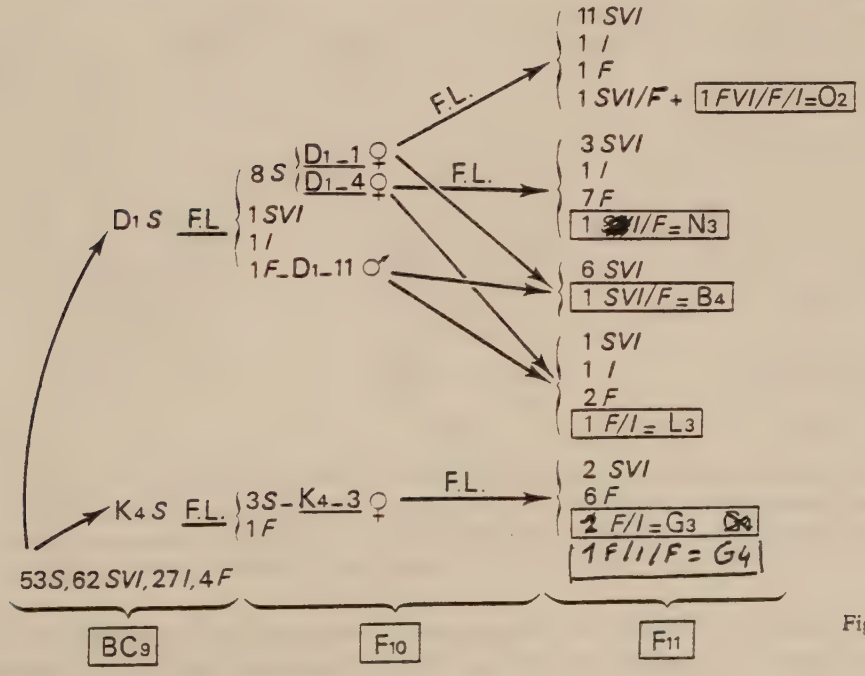

11 SVI
1 I
1 F
1 SVI/F + 1 FVI/F/I=O2
F.L.
3 SVI
1 I
7 F
1 SVI/F=N3
F.L.
6 SVI
1 SVI/F=B4
1 SVI
1 I
2 F
1 F/I=L3
2 SVI
6 F
1 F/I=G3
1 F/I/F=G4
F.L.
D1 S F.L.
8 S D1-1 ♀ D1-4 ♀
1 SVI
1 I
1 F D1-11 ♂
K4 S F.L.
3 S - K4-3 ♀
1 F
53 S, 62 SVI, 27 I, 4 F
BC9
F10
F11

Fig. 2

— sur la plante O_2 (*fig.* 8), les deux modalités de la réversion somatique, progressive et subite, se superposent mais vont dans le même sens. Cette plante est symbolisée « FVI/F/I ».

L'originalité de chacune de ces six plantes quant à la fréquence d'émission de tiges de phénotypes différents, quant à leur localisation sur la plante et quant à leur ordre d'apparition dans le temps, semble exclure pour l'instant une approche quantitative.

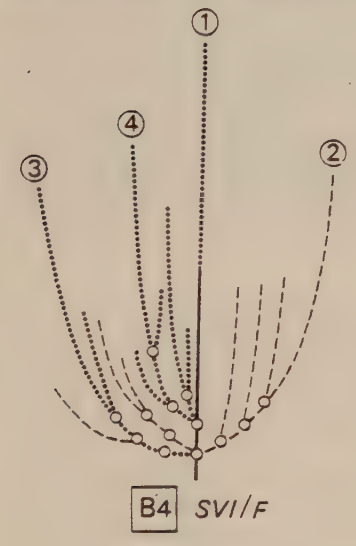


Fig. 3

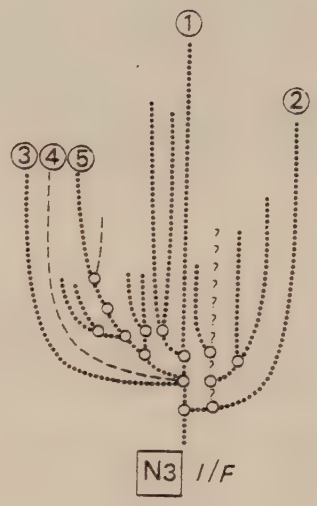


Fig. 4

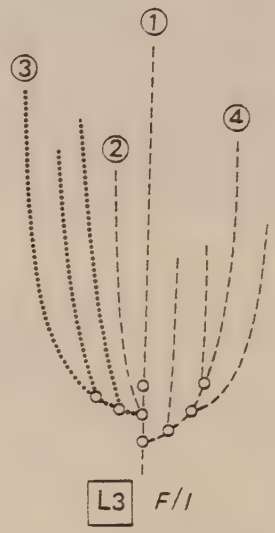


Fig. 5

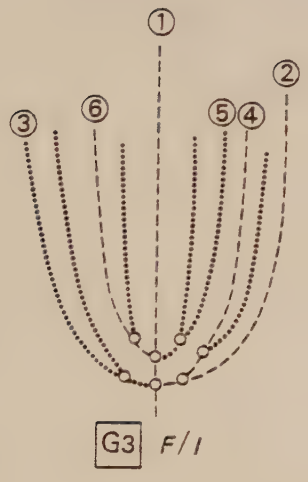


Fig. 6

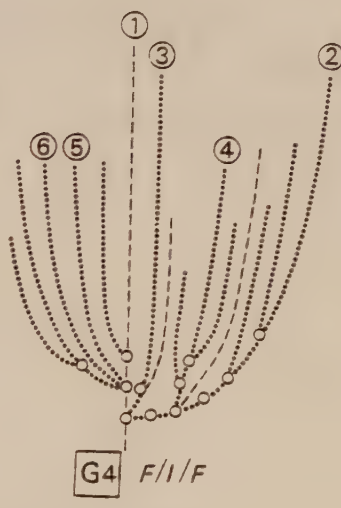


Fig. 7

Fig. 8

Fig. 3 à 8. — Représentation schématique des six plantes étudiées. Les phénotypes sont symbolisés ainsi : S, mâle-stérile, par un trait continu; F, mâle-fertile, par des tirets; I, intermédiaire, par des pointillés. Les numéros cerclés correspondent à l'ordre d'apparition des tiges. Les petits cercles représentent les nœuds. Dans la figure 4, plante N_3, une ramification issue du premier nœud de la tige (2) n'a pu être notée.

CONCLUSIONS. — Mis à part deux observations ponctuelles [(7), (8)], nous avons pu ainsi constater que sur six plantes présentant une modalité subite de la réversion somatique, quatre manifestent ce phénomène vers une moindre fertilité, du phénotype F au phéno-

type I. L'étude des descendances, qui est en cours, nous indiquera si ces modifications phénotypiques reflètent des différences dans le matériel héréditaire, comme cela a été démontré pour les plantes S/F ([2]) et SVI ([6]).

Cette constatation peut être intéressante sur le plan agronomique. L'origine de ces plantes (*fig.* 2) peut indiquer la possibilité d'une sélection maternelle.

Sur le plan de l'interprétation génétique des phénomènes, la réversibilité des modifications phénotypiques ne semble pas correspondre à une évolution pathologique (contagion ou guérison d'une virose). Par contre, elle renforce l'hypothèse de travail précédemment émise ([4]) d'une hétérogénéité cytoplasmique. Dans les cellules de plantes mâle-stériles cytoplasmiques instables coexisteraient deux types de cytoplasmones en quantités relatives variables. Les uns déterminent la stérilité, les autres la fertilité pollinique; l'évolution relative de ces deux types de cytoplasmones se manifesterait par des modifications du phénotype pollinique.

(*) Séance du 22 mai 1978.

([1]) Avec la collaboration technique de Madina Ferault. Les figures ont été réalisées par Marie-Jeanne Defoug. Ce travail a bénéficié du support financier de l'A.M.S.O.L.-Protéagineux.

([2]) D. A. Bond, J. L. Fyfe et G. Toynbee-Clarke, *J. agric. Sc. Camb.*, 66, 1966, p. 359-377.

([3]) P. Berthelem, *Rapport d'activité de la Station d'Amélioration des Plantes de Rennes*, I.N.R.A., 1968-1970.

([4]) H. Thiellement, *Ann. Amélior. Plantes*, 27, (2), 1977, p. 203-209.

([5]) H. Thiellement, *Ann. Amélior. Plantes*, 27, (5), 1977, p. 547-553.

([6]) H. Thiellement, *Ann. Amélior. Plantes*, 27, (5), 1977, p. 554-563.

([7]) J. P. Hofmann, *Contribution à l'étude de la stérilité mâle de la Féverole*, D.E.A-Université de Paris-Sud, 1972.

([8]) J. Le Guen, Communication personnelle, 1975.

([9]) Le pollen fécondant ces plantes était homogène génétiquement (BC_9 vers BC_{10}) et mainteneur de stérilité. Ces plantes étaient les seules Féveroles dans la serre et alentours.

Institut national de la Recherche agronomique, Laboratoire d'Amélioration des Plantes,
Bât. 360, *Université de Paris-Sud*, 91405 *Orsay Cedex* 05.

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 288 (5 mars 1979) Série D — 827

GÉNÉTIQUE VÉGÉTALE. — *Sur quelques descendances de plantes présentant simultanément deux phénotypes polliniques à déterminisme non mendélien chez* Vicia faba L. Note (*) de **Hervé Thiellement** [1], présentée par André Cauderon.

Les plantes mâle-stériles (androstérilité à déterminisme nucléo-cytoplasmique) de Féverole peuvent présenter des modifications somatiques subites du phénotype pollinique. Nous rapportons ici les données recueillies en étudiant les descendances maternelles de 10 plantes de ce type, présentant simultanément deux phénotypes polliniques sur des tiges différentes. Une plante S et F fournit des descendances différentes selon le phénotype des tiges. C'est également le cas de plantes à tiges F et I quand elles sont elles-mêmes issues d'un phénotype I, alors que les plantes à tiges F et I issues d'un phénotype S ne donnent que des descendants F.

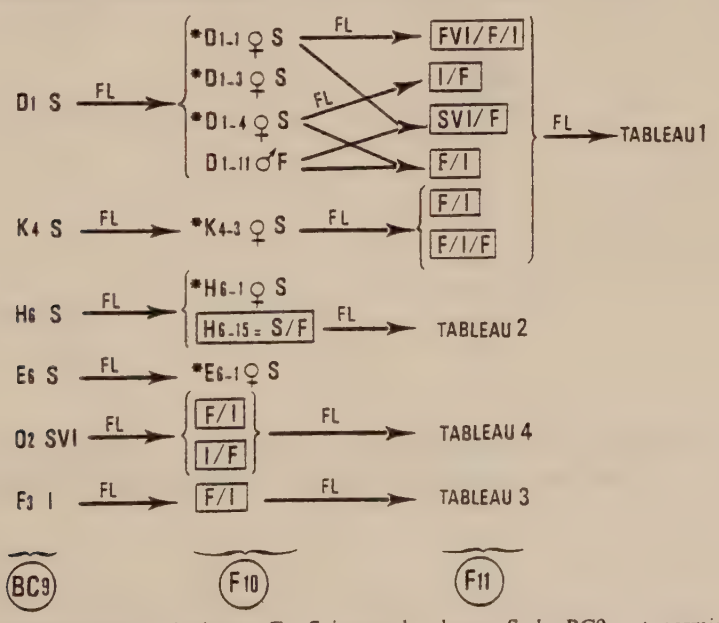
Male-sterile plants (the male sterility is determined by an interaction between nuclear and cytoplasmic factors) of field bean can present sudden somatic modifications of the pollen phenotype. We report here the maternal offspring of 10 plants of that kind, showing two pollen phenotypes simultaneously on different tillers. An S and F plant furnishes different offspring according to the phenotype of the tillers. This is also the case of plants with F and I tillers when they are themselves issue from an I phenotype, but plants with F and I tillers when from an S phenotype give a progeny entirely F.

INTRODUCTION. — La stérilité mâle à déterminisme nucléo-cytoplasmique chez *Vicia faba* L. ([2], [3]) (cytoplasme « Cambridge 447 ») présente 3 particularités [4] : la restauration permanente, l'instabilité et la réversion somatique. Dans une Note précédente [5], où sont définies ces particularités, nous rapportions l'observation de plantes présentant la réversion somatique dans un sens inhabituel, vers une moindre fertilité pollinique. Nous étudions ici la descendance maternelle des 6 plantes précédemment décrites [5] ainsi que celle de quatre autres plantes ayant présenté simultanément deux phénotypes polliniques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Avec 3 phénotypes polliniques ('S' pour mâle-stérile, 'F' pour mâle-fertile et 'I' (intermédiaire) pour toute observation n'entrant dans aucune des 2 précédentes catégories), on définit des plantes :

— 'S', 'I' ou 'F' mais aussi

— 'SVI' ou 'IVF' pour des plantes présentant une modification progressive du phénotype en cours de floraison, simultanément sur les différentes tiges, de S vers I ou de I vers F:



Généalogie. Les plantes notées*, 6 plantes F_{10} S issues de plantes S du BC9 ont permis d'estimer une descendance F_{11} "S de S" (témoin du tableau II). Les plantes encadrées sont celles dont les descendances sont étudiées.

— 'X' pour les plantes présentant une réversion somatique subite. On note S/F une plante S pour la tige principale et F pour une ou plusieurs tiges secondaires, ou encore F/I/F une plante F avec une ou plusieurs tiges secondaires I et des tiges F issues de ces tiges I.

La génération F_{10} est issue par fécondation libre en isolement du neuvième rétrocroisement (BC9) de la lignée Ad23 sur le cytoplasme 447.

Les plantes S de la F_{10} provenant de plantes S du BC9 (voir *fig.*), ont été, soit croisées avec des plantes sœurs F provenant de S, soit laissées en fécondation libre. L'ensemble de ces descendances (90 plantes) constitue une F_{11}. Dans cette F_{11} ont été tirées les 6 plantes précédemment décrites [5].

Nous avons étudié les descendances en fécondation libre :

— de 4 plantes F_{10} présentant une réversion somatique subite (voir *fig.*) : 1 plante S/F « talle stérile » provenant d'une plante S du BC9; 1 plante F/I provenant d'une plante I du BC9; 2 plantes sœurs F/I et I/F provenant d'un secteur I d'une plante SVI du BC9. Ces plantes ont fourni 4 descendances F_{11} cultivées en champ:

— des 6 plantes F_{11} détaillées précédemment [5] : 1 plante SVI/F, 1 plante I/F, 2 plantes F/I, 1 plante F/I/F et 1 plante FVI/F/I toutes provenant de plantes S issues elles-mêmes d'une plante S du BC9. Ces plantes ont fourni 6 descendances F_{12} (dont 2 cultivées en serre et 4 en champ).

RÉSULTATS. — 1. *Les descendances* F_{12} (tableau I).

TABLEAU I

Phénotypes Plante mère	Phénotypes tiges	Phénotypes F_{12}	Effectifs
FVI/F/I.....	FVI	1 F	42
	F	28 F	
	I	13 F	
SVI/F.....	SVI	1 F/I	44
		7 F	
	F	36 F	
F/I.....	F	3 F	19
	I	16 F	
I/F.....	I	8 F	11
	F	3 F	
F/I.....	F	27 F	75
	I	48 F	
F/I/F.....	F	2 F	2

Mis à part une plante F/I, encadrée dans le tableau I, ces descendances, qu'elles proviennent de tiges ou de secteurs I ou F sont entièrement fertiles.

2. *Les descendances* F_{11}. — (*a*) *de la plante* S/F *provenant d'une plante* S (tableau II).

TABLEAU II

Phénotypes		S	SVI	I	IVF	F	X	Effectif
Tiges F		–	–	–	–	31	–	31
Tiges S	effectif	–	10	–	–	25	4 S/I 1 SVI/F	40
	fréquence	–	.25	–	–	.63	.12	
S de S*	effectif	–	46	5	–	32	7	90
	fréquence	–	.52	.05	–	.35	.08	

* Il s'agit de l'ensemble des descendances F_{11} des plantes S de la F_{10}, provenant de plantes S du BC9 [7] (*fig.*).

Les tiges F ne fournissent que des descendants F mais les tiges S fournissent des descendants SVI. F et X. Malgré les effectifs limités, on peut remarquer une nette tendance chez ces tiges S de plantes S/F à fournir une descendance globalement plus fertile que les plantes homogènes S.

(*b*) *de la plante* F/I *provenant d'une plante* I *du* BC9 (tableau III).

TABLEAU III

Phénotype	S	SVI	I	IVF	F	X	Effectif
Tiges F	–	–	–	–	23	–	23
Tiges I	–	–	6	–	1	1 I/F	8

Bien que le nombre de graines recueillies sur ces tiges I soit faible, les 2 types de tiges ne fournissent pas les mêmes descendances.

(*c*) *des plantes sœurs* F/I *et* I/F *provenant d'un secteur* I *d'une plante* SVI *du* BC9 [8] (tableau IV).

TABLEAU IV

Phénotypes		S	SVI	I	IVF	F	X	Effectif
F/I	tiges F	–	–	–	–	71	–	71
	tiges I	–	–	2	–	3	1 F/I 1 I/IVF	7
I/F	tiges F	–	–	1	–	26	–	27
	tiges I	–	–	2	–	11	1 F/I 1 I/F	15

Les deux types de tiges ne fournissent pas les mêmes descendances. Une plante fait exception (encadrée dans le tableau IV), plante I issue d'une tige F.

DISCUSSION. — Pour la plante S/F (tableau II), nous retrouvons les résultats de Bond et coll. [1] : les 2 types de tiges de phénotypes extrêmes S et F se comportent comme génétiquement différents. Comme pour les plantes homogènes S de la même génération [7] on ne retrouve plus de descendants S. Mais les proportions des différents phénotypes dans la descendance des tiges S indiquent une tendance vers la fertilité plus marquée que chez les plantes S homogènes de la même génération.

Pour les 9 autres descendances issues de tiges phénotypiquement I ou F, on distingue nettement deux groupes :

— des descendances entièrement fertiles pour les tiges F et les tiges I, descendances de plantes X provenant de plantes S (tableau I);

— des descendances fertiles pour les tiges F, en ségrégation I, F, X pour les tiges I, descendances de plantes X provenant de plantes I ou SVI (tableaux III et IV).

Ces résultats peuvent être rapprochés des observations recueillies lors de l'étude de la F_{11} [7] où on peut démontrer l'influence du phénotype de la plante grand-mère sur la descendance (effet grand-mère) : les plantes I ne fournissent pas les mêmes proportions de phénotypes selon qu'elles proviennent elles-mêmes de plantes I ou de plantes SVI. En se situant à un autre niveau de comparaison, on peut distinguer ici les descendances de plantes F/I ou I/F selon qu'elles proviennent de plantes S (tableau I) ou de plantes I et SVI (tableaux III et IV).

2 plantes font exception, une plante F/I dans les descendances F_{12} (tableau I), une plante I issue d'une tige F dans les descendances F_{11} (tableau IV). Ces exceptions renforcent l'hypothèse de travail précédemment émise [4] d'hétérogénéité cytoplasmique. Le phénotype F pourrait être l'expression (plus ou moins lointaine dans la morphogenèse de la plante et dans le décalage entre les gamétogènes mâle et femelle) d'un cytoplasme hétérogène ou subsistent, bien que contre-sélectionnés, les déterminants de la stérilité pollinique.

Conclusion. — Il parait peu probable que l'on aboutisse par sélection maternelle à un cytoplasme mâle-stérile stable, c'est-à-dire utilisable en sélection : les plantes S ne se retrouvent plus en F_{11} et les plantes présentant une réversion somatique vers une moindre fertilité (de F à I) se comportent comme génétiquement F quand elles proviennent de plantes S. Le phénotype I, par contre, semble avoir une stabilité relative plus grande, qui reste à interpréter. En effet, les tiges I de plantes F/I ou I/F provenant elles-mêmes d'un phénotype I, vont se comporter en descendance comme génétiquement différentes des tiges F.

Ces résultats constituent une confirmation de l'influence du phénotype de la plante grand-mère sur la descendance (effet grand-mère) [7].

(*) Remise le 29 janvier 1979 et acceptée, après révision le 5 mars 1979.

[1] Avec la collaboration technique de Madina Ferault, Joël Blaisonneau et Lionel Saunois et le support financier de l'A.M.S.O.L.-Protéagineux.

[2] D. A. Bond, J. L. Fyfe et G. Toynbee-Clarke, *J. Agric. Sc. Cambridge*, 66, 1966, p. 359-377.

[3] P. Berthelem, Rapport d'activité de la Station d'Amélioration des Plantes de Rennes, I.N.R.A., 1968-1970.

[4] H. Thiellement, *Ann. Amélior. Plantes*, 27, (2), 1977, p. 203-209.

[5] H. Thiellement, *Comptes rendus*, 287, série D, 1978, p. 29.

[6] H. Thiellement, *Ann. Amélior. Plantes*, 27, (5), 1977, p. 547-553.

[7] H. Thiellement, 1979 (à paraître).

[8] Ces données ont été recueillies lors d'un stage de D.E.A. effectué au Laboratoire par Véronique Bokor.

Institut national de la Recherche agronomique,
Laboratoire d'Amélioration des Plantes,
Bât. 360, *Université de Paris-Sud*, 91405 *Orsay Cedex* 05.

Ann. Amélior. Plantes, 1979, **29** (2), 163-171.

Cytoplasmic male sterility in *Vicia faba* L. IV. — A grand-mother effect

H. THIELLEMENT

avec la collaboration technique de Madina FÉRAULT et J. BLAISONEAU

Laboratoire d'Amélioration des Plantes, I.N.R.A., Université de Paris-Sud, Bat. 360 91405 Orsay Cedex

Summary

The " 447 " male-sterile cytoplasm is not yet useful to produce hybrid varieties of field beans. We try to obtain its stability through a maternal selection but we do not find any more S (male-sterile) plants in the offspring (F_{11}) of F_{10} S plants from BC9 S plants. S plants give the same progeny as crossed by F (male-fertile) sister plants or freepollinated. And I plants give the same progeny as selfpollinated or freepollinated.

The I plants give different proportions of phenotypes depending if they are themselves issued from I plants or from SVI plants. That influence of the grand-mother plant on the offspring has been called a " grand-mother effect ".

Introduction

To enhance and regularize yield in field beans (*Vicia faba* L.) could permit the extension of a european source of proteins. That goal could be reached by the production of hybrid varieties through the utilisation of a nucleo-cytoplasmic male-sterility system. But, since the discovery by BOND in 1957 of the " 447 " male sterile cytoplasm, no hybrid varieties has been produced, because of the lack of stability of that cytoplasm.

In fact, according to several authors (BOND *et al.*, 1966; BERTHELEM, 1970; BERTHELEM and LE GUEN, 1974) that so called " 447 " cytoplasm presents three peculiarities: (1) appearance of male fertility can be somatic where one plant shows different phenotypes, for instance male sterile and male fertile sectors, it is called " somatic reversion ". (2) " 447 " cytoplasm is unstable and gives rise to male fertile plants in the progenies of crosses between cytoplasmic male

sterile and maintainer lines (maintainer for male sterility, no restorer factors in the genotype). (3) The restoration is permanent and is due to one dominant " major " gene. One quarter male sterile plants are expected in the F_2 of the hybrid between male sterile and restorer lines, but nearly all F_2 plants are fertile with the frequency of exceptions ranging from none to 3 out of 700, according to BOND *et al.*, 1966. Pollen from fertile plants or fertile sectors of plants described in (1) and (2) and from about one quarter of the F_2 plants (3) give the same offspring as a maintainer when tested on a male sterile line. This fact excludes a nuclear mutation from *rf* to R*f*. The three peculiarities could be, therefore, interpretated as a cytoplasmic modification from a sterile to a fertile state.

Earlier experiments led to the following observations: (1) A large heterogeneity in phenotype was observed in the ninth backcross (BC9) of a male sterile line, both between and within plants (THIELLEMENT, 1977*b*). (2) The observed heterogeneity is due partly to somatic reversion causing a high proportion of the plants to show a more fertile (intermediate) phenotype. Each plant is affected independantly and all the tillers of one plant are affected simultaneously (THIELLEMENT, 1977*b*). (3) These modifications of the phenotype reflect some hereditary change since the different proportions of phenotypes in their offspring (see below Table 1 from THIELLEMENT, 1977*c*). (4) We exceptionally observe plants that exhibit an unusual somatic reversion towards a more male sterile state (THIELLEMENT, 1978).

The experiments reported here describe the segregation patterns of the different plant phenotypes in F_{11} (from BC9 to F_{10} to F_{11}) and were addressed towards three questions: (1) Is it possible to obtain a stable male sterile cytoplasm by means of maternal selection? (2) What influence does the male parent have? (3) Does the phenotype of the grand mother plant have any effect on the offspring?

Material and methods

Material

The 9th back-cross (BC9) of a spring type of field bean " Ad 23 " (from BERTHELEM) on the " 447 " male-sterile cytoplasm was provided by the Institut National de la Recherche Agronomique.

Classification of flower phenotypes

Three phenotypes were defined by visual observations of the mature, unopened flowers: " S " for male sterile with no pollen detectable and shrunken grey-brown stamens. " F " for male fertile with abundant white pollen and usually black stamens. " I " for intermediate, semi-sterile flowers not classifiable as S or F.

In ALEXANDER's method (1969) for microscopic pollen coloration, these phenotypes correspond to less than 15 p. 100 of viable pollen grains and no pollen tube growth in DEXHEIMER's medium (1970) for S, and for I between 15 and 50 p. 100 viable pollen grains and some tubes growing in DEXHEIMER's medium.

Classification of plant phenotypes

Flowers on each tiller of each plant were observed approximately each week during the flowering period. Since one plant can present different flower phenotypes we recorded: (1) an " S ", " I " or " F " for a plant showing the same flower phenotype on all the tillers throughout the flowering period. (2) " SVI " for a plant showing a sterile to intermediate phenotype for all the tillers simultaneously. (3) "IVF" for plants with intermediate to fertile flowers and (4) an " X " for plants with different tillers having different phenotypes, *eg.* " S/F " denotes a plant with an " S " main tiller and an " F " for one or more secondary tillers.

Generations

BC9 plants displayed considerable phenotype heterogeneity; of 146 plants, 36 p. 100 were classifiable as S, 42 p. 100 as SVI, 19 p. 100 as I and 3 p. 100 as F. The " F_{10} " was obtained by open pollination of the BC9 in isolation. The grains were harvested separately at each node of each tiller of each plant.

The table 1 shows the frequencies of the different plant phenotypes obtained from BC 9 (from THIELLEMENT, 1977*c*).

TABLE I

F_{10}: Phenotypic frequencies in the F_{10} progeny of open pollinated BC 9 plants

BC9 mother plant phenotype (number)	F_{10} progeny phenotype						Number of F_{10} plants
	S	SVI	I	IVF	F	X	
S(8)	.63	.13	.04	.00	.18	.02	45
S (pre) sectors of SVI(5)	.02	.14	.41	.00	.41	.02	51
I(6)	.00	.10	.33	.04	.50	.03	90
I (post) sectors of SVI(9)	.00	.06	.30	.00	.58	.06	77
F(2)	.00	.00	.00	.00	1.00	.00	24

BC 9 S plants gave in F_{10} 63 p. 100 S plants but also varying amounts of the other phenotypes; whereas only F progeny were obtained from BC 9 F plants. The progeny of SVI plants were subdivided into that derived from S sectors and that from I sectors of the plants, since the 2 sectors gave different proportions of the different phenotypes when the comparison is made on the SVI plants which gave the two kinds of progeny (THIELLEMENT, 1977*c*). The " F_{11} " originated from the F_{10} by free pollination, self pollination, or controlled crosses between F_{10} plants.

Three generations were studied under the same conditions: a 16 hour photoperiod in a greenhouse. The plants were spaced 0,6 m between the rows and 0,4 m within a row, allowing individual observation and favouring the tillering of the plants.

Results

1. — *Offspring from S plants*

In order to test the possibility of selecting maternally for a stable male sterile cytoplasm, the progeny of S plants from F_{10}, themselves derived from BC 9 S plants were scored. The offsprings were obtained partly from free pollination and partly from controlled pollination by pollen taken from fertile sister plants, i.e. FF_{10} plants from S BC 9 mothers. The progeny of 6 of these S derived from S plants were analysed and the results are presented in table 2.

TABLE 2

F_{11}: Offspring of S plants - Frequencies of the different plant phenotypes.

F_{10} S mother plants	F_{11} Phenotypes						Number of F_{11} plants
	S	SVI	I	IVF	F	X	
Freely pollinated	.00	.49	.06	.00	.37	.08	67
Crossed by F from S	.00	.57	.04	.00	.30	.09	23
Total	.00	.52	.05	.00	.35	.08	90

It can be seen that no second generation S plants were found. This result would seem to exclude the possibility of maternal selection towards a stable male sterile cytoplasm. Also, although the number of plants produced by controlled crosses is small, there was no difference between the two distributions. If all the F_{10} F plants from BC 9 S plants originated from an rf to Rf mutation, one should expect at least (and probably more) 50 p. 100 F plants in the controlled cross progeny. Therefore, it seems likely that no restorer genes were present in those F plants derived from S mothers, as had been previously supposed.

2. — *Offspring from I plants*

In order to determine whether any genetic difference between pollen taken from plants of different phenotypes could be detected, the progeny of some I plants of F_{10} was scored. The progenies of 9 I plants, the ones which gave seeds by both self pollination and free pollination, are presented in table 3. Those plants, chosen on their ability to selfpollination can, thus, be considered phenotypically similar, at the more fertile limit of the I class.

The χ^2 test performed on the 2 distributions (contingency Table 2 × 4) and by grouping of SVI + I and IVF + F classes (contingency Table 2 × 2)

TABLE 3

F_{11}: Offspring of I plants obtained by self and free pollination
Frequencies of the different plant phenotypes

F_{10} I Mother Plants	F_{11} Phenotypes						Number of F_{11} plants
	S	SVI	I	IVF	F	X	
Self pollinated	.00	.10	.32	.00	.53	.05	38
Free pollinated	.00	.06	.32	.02	.46	.14	104
Total	.00	.07	.32	.01	.48	.12	142

show that there is no difference between the two kinds of progenies ($p > .50$). Therefore I pollen is equivalent to the circulating, mainly F pollen. The circulating pollen is supposed to be mainly from F plants since only a few I plants are able to selfpollinate, giving in that way few seeds and since all the F_{10} plants gave seeds which indicate a good insect pollination and then a good circulation. This further confirms the maternal, cytoplasmic determination of the phenotype of the pollen.

It can also be seen that the general distribution is the same as that found in the preceding F_{10} generation (see table 1).

Since we know the maternal genealogy of each plant, we can compare the progenies of the I plants originating from I plants of BC 9 on the one hand (4 mother plants) to that of the I plants originating from SVI plants of BC 9 on the other hand (5 mother plants).

The description of these progenies obtained both through self and free pollination is given in Table 4.

The χ^2 test made on the two distributions (Contingency table 2×4) gives a $.10 > p > .05$ and grouping SVI + I and IVF + F (Contingency table 2×2) $p < .02$.

That table indicates that the progeny of an I plant, itself derived from an

TABLE 4

F_{11}: Offspring of I plants from I and from SVI plants
Frequencies of the different plant phenotypes

F_{10} I Mother Plants	F_{11} Phenotype						Number of F_{11} plants
	S	SVI	I	IVF	F	X	
I from I.	.00	.12	.40	.00	.38	.10	52
I from SVI	.00	.05	.27	.02	.53	.13	91

I mother, is different from the progeny of an I plant produced by an SVI mother. The offspring of an I plant is thus dependant upon the phenotype of the grand mother plant. In that table, as in the previous ones, we sum the different individual progenies. As previously shown (THIELLEMENT, 1977*c*) there is a great heterogeneity between individual progenies, especially as concern the number of seeds harvested on each mother plant and then, in the number of plants in each phenotypic class.

Therefore the assumption that the progeny of an I from I plant is different of the progeny of an I from SVI plant must be understood as a general effect and not as true for each individual plant. That " grand mother effect " may thus be considered as a greater probability for an I plant to give a more fertile progeny when from an SVI plant than when from an I plant. This result further enhances the notion of maternal cytoplasmic determination.

Discussion

Instability of cytoplasmic male sterility has been reported in maize (SINGH and LAUGHNAN, 1972) and in pearl millet (BURTON, 1972, 1977; CLEMENT, 1975). Except for permanent restoration, the same features have been encountered in some of the known cytoplasms of those two crops.

A genetic interpretation was proposed by LAUGHNAN and GABAY (1975) who suggested that episomial element may lead to pollen abortion when free in the cytoplasm, may be integrated either in the mitochondrial genome and behave as a cytoplasmic reverse mutation, or in the nuclear genome on various location with a restorer behaviour (LAUGHNAN and GABAY as cited by LEVINGS and PRING, 1978). CLEMENT (1975) prefers a hypothesis where the " plasmon " mutates from " S " to normal at a rate depending upon the nuclear background. Those two interpretations however provide for a sudden and random event and do not readily account for the phenomena encountered in field bean, particularly as concerns the " I " phenotypes and the simultaneous modification of all the tillers of one plant (the SVI, IVF plants).

We proposed earlier (THIELLEMENT, 1977*a*) a working hypothesis of cytoplasmic heterogeneity. In an unstable male sterile line, two kinds of plasmons coexist, those leading to male sterility and those to male fertility. They are present in different proportions for each plant, and these proportions can be stable, at least for the lifespan of a plant, leading to a similar pollen phenotype (S, I and F plants). The proportions can also be modified and then we observe phenotypic modification. The SVI plants are the most frequent examples where a progressive drift is seen towards a more fertile state.

The proportions can also be suddenly modified by unequal mitotic segregations. That is the case of the " X " plants. That is also what happens during female gametogenesis, and it leads to ovules with proportions different from those of the mother. It can be seen that this is not strictly speaking a maternal heredity, since the phenotype of the offspring is not always the same as that of the mother. At all times a selection pressure is acting, favouring the plasmons leading to male fertility.

The segregation patterns of F II are not inconsistant with the hypothesis. Moreover, the effect of the grand mother (Table 4) can be interpretated as a long term effect of the cytoplasmic instability occuring in SVI plants. We have seen that I sectors from SVI plants give a progeny globally more fertile than the

I plants themselves as discussed previously (THIELLEMENT, 1977*c*) (see table 1). The same result is obtained one generation later, I from SVI plants giving a more fertile progeny than I from I plants, suggesting the " instability potential " is more important in plants issued from an SVI mother.

That grand mother effect, here demonstrated on few families of I plants, has been confirmed at an another level by recent experiments (THIELLEMENT, 1979) where are studied the offspring of X plants (F/I and I/F plants). When from an S plant, those F/I and I/F plants give a progeny entirely fertile, whatever the tillers; but when from an I phenotype, I tillers of F/I and I/F plants give different phenotypes (I, F, X) in their progeny.

The grand mother effect in *Vicia faba* can be compared to necessary delays of expression of cytoplasmic mutations. An event such as a reverse mutation of cytoplasmic DNA may take two generations to be expressed. It seems reasonable to suppose that since numerous molecules are present in any one cell and, without recombination, many mitoses would be necessary, even for a positively selected molecule, in order to reach the threshold necessary for expression of a new phenotype.

One question, for which we have as yet no answer, concerns the I phenotypes. Are they due to a mixture of two kinds of plasmons, in a relatively stable equilibrium, or are they due to an " allelic " I state, or both? We may point out that the segregations of phenotypes from I plants (whatever the grand-mother) is the same in F_{10} and F_{11} (tables 1 and 3) but that this is not the case for offspring from S plants (table 1 and 2). This may be considered as an argument for the stability, evidently relative, of the I state throughout succeeding generations.

Finally, the concept of cytoplasmic heterogeneity was first proposed by GRUN *et al.* (1962) as an interpretation of his observations betweeen species of *Solanum*. It was later demonstrated for plants of a population in *Origanum vulgare* (KHEYR POUR, 1975) and in *Allium cepa* (BERNINGER, 1976) by genetic experiments. Some recent biochemical analyses of cytoplasmic DNA confirms this idea (QUETIER and VEDEL, 1977; LEVINGS and PRING, 1977, 1978; PRING and LEVINGS, 1978).

In Eucaryotes, experiments carried out in such diverse animals as *Paramecium aurelia* (ADOUTTE and BEISSON, 1972; SAINSARD *et al.*, 1974), *Drosophila melanogaster* (PICARD, 1971, 1977; BUCHETON, 1978; BUCHETON and PICARD, 1975, 1978) or *Culex pipiens* (FRENCH, 1970, 1978; SUBBARAO *et al.*, 1977) can be taken as interesting analogies.

Conclusion

For the plant breeder, it seems hopeless to obtain a stable male sterile cytoplasm by a maternal selection of the " 447 ". But other ways are open to find new cytoplasms, especially through mutagenesis experiments.

It has been demonstrated recently (LE GUEN *et al.*, DUC, 1978) that the pollen phenotype is influenced by the temperature or by light and temperature combined stress. Consequently, the constant behaviour of the I phenotype throughout succeeding generations in greenhouse conditions seems very interesting to elucidate.

The experiments reported here suggest the influence of the grand-mother plant on the phenotypes of the offspring. That can be interpretated by the previously ennounced hypothesis of cytoplasmic heterogeneity, but biochemical experiments are in progress in order to obtain a clear cut evidence of its validty.

Reçu pour publication en mars 1979.

Aknowledgements

Financial support was provided by A.M.S.O.L. Proteagineux. I would like to thanks Pr. Y. DEMARLY, Pr. J. C. MOUNOLOU and Dr. A. GALLAIS for the interest they have discussing the results and especially Dr. P. SIMPSON for her help writing this paper in english.

Résumé

La stérilité mâle cytoplasmique chez Vicia faba *L. IV. — Un effet grand-mère*

Le cytoplasme mâle-stérile « 447 » ne peut actuellement être utilisé pour produire des variétés hybrides de Féveroles. Nous rapportons ici les données recueillies lors de l'étude de la F_{11} (3e génération en serre à partir du BC9 de la lignée mâle-stérile Ad23/447).

Une sélection maternelle généalogique (pour cytoplasmique) à l'intérieur d'une lignée génétiquement homogène ne semble pas suffisante pour aboutir à un cytoplasme mâle-stérile stable utilisable en sélection. En effet, on ne retrouve plus de plantes S (mâle-stérile) dans la descendance de plantes S (F_{10}) issues de plantes S (BC9) (tabl. 2).

L'importance du parent mâle n'apparaît pas puisque les plantes S (F_{10}) fournissent le même type de descendances en fécondation libre (isolement de la F_{10}) et en croisement avec les plantes sœurs F (mâle-fertile) issues de plantes S du BC9 (tabl. 2). De même, les plantes I (intermédiaires) fournissent le même type de descendances en fécondation libre comme en autofécondation (tabl. 3).

On distingue par leur généalogie les plantes I (F_{10}) issues de plantes I (BC9) des plantes I (F_{10}) issues de plantes SVI (BC9). Ces deux groupes de plantes phénotypiquement identiques fournissent des proportions différentes des différents phénotypes (tabl. 4). On met ainsi en évidence l'influence du phénotype de la plante grand-mère sur la descendance (effet grand-mère).

Les plantes I donnent les mêmes proportions de descendants (dont environ 50 p. 100 de F) en F_{11} (tabl. 3) et en F_{10} (tabl. 1) contrairement aux plantes S (tabl. 2 et 1). Cette relative stabilité du phénotype I à travers les générations pose question.

L'ensemble de ces données sont discutées dans le cadre de l'hypothèse d'une hétérogénéité cytoplasmique.

References

ADOUTTE A., BEISSON J., 1972. Evolution of genetically mixed mitochondrial populations in *Paramecium*. *Nature*, **235**, 393-396.

ALEXANDER M. P., 1969. Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Technol.*, **44**, 117-122.

ASHRI A., 1976. Frequencies of plasmon types in a germ sample of peanuts, *Arachis hypogea*. *Euphytica*, **25**, 777-785.

BERNINGER E., 1976. Évolution de la stérilité mâle cytoplasmique dans les populations d'oignon. *Ann. Amélior. Plantes*, **26**, 549-563.

BERTHELEM P., 1970. *Rapport d'Activité de la Station de Rennes. INRA* 1968-1970.

BERTHELEM P. and LE GUEN J., 1974. *Rapport d'Activité de la Station de Rennes. I.N.R.A.*, 1971-1974.

BOND D. A., FYFE J. L., TOYNBEE-CLARKE, 1966. Male sterility in field beans. III. Male sterility with a cytoplasmic type of inheritance. *J. agric. Sci.*, **66**, 359-367.

BUCHETON A., 1978. Non-mendelian female sterility in *Drosophila melanogaster* : influence of ageing and thermic treatments. *Heredity*, **41**, 357-369.

BUCHETON A., PICARD G., 1975. Mise en évidence d'une influence partiellement héritable de l'âge sur un phénomène de stérilité femelle à déterminisme non mendélien chez *Drosaphila melanogaster*. *C. R. Acad. Sci.* Paris, **281**, Série D, 1035-1038.

BUCHETON A., PICARD G., 1978. Non-mendelian female sterility in *Drosophila melanogaster* : Hereditary transmission of reactivity levels. *Heredity*, **40**, 207-223.

BURTON G. W., 1972. Natural sterility maintainer and fertility restorer mutants in Tift 23 A1 cytoplasmic male-sterile pearl millet, *Pennisetum typhoides* (BURM.) Stapf and Hubb. *Crop Sci.*, **12**, 280-282.

BURTON G. W., 1977. Fertile sterility maintainer mutants of cytoplasmic male sterile pearl millet. *Crop Sci.*, **17**, 635-637.

CLEMENT W. M., 1975. Plasmon mutations in cytoplasmic male-sterile pearl millet, *Pennisetum typhoides*. *Genetics*, **79**, 583-588.

DEXHEIMER J., 1970. Recherches cytophysiologiques sur les grains de pollen. *Rev. Cytol. Biol. veg.*, **33**, 169-234.

DUC G., 1978. *Modalités d'expression et hypothèses explicatives du manque de stabilité de la stérilité mâle cytoplasmique de la féverole* (Vicia faba *L.*), Thèse Dr Ing. Univer. Paris-Sud Orsay, 59 p. + illustr.

EDWARDSON J. R., 1970. Cytoplasmic male sterility. *Bot. Rev.*, **36**, 341-420.

FRENCH W. L., 1970. Evidence for the segregation of cytoplasmic genes in *Culex pipiens* an advanced form of animal life. *Genetics* (Abstr.), **64**, S. 22.

FRENCH W. L., 1978. Genetic and phenogenetic studies on the dynamic nature of the cytoplasmic inheritance system in *Culex pipiens*. *Genetics*, **88**, 447-455.

GRUN P., AUBERTIN M., RADLOW A., 1962. Multiple differentiation of plasmons of diploid species of *Solanum*. *Genetics*, **47**, 1321-1333.

KHEYR POUR A., 1975. *Déterminisme génétique et répartition écologique de la stérilité mâle cytoplasmique dans les populations naturelles d'*Origanum vulgare *L.* Thèse, Univ. Sc. et Techn. du Languedoc. Montpellier, 167 p.

LASER K. D., LERSTEN N. R., 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Bot. Rev.*, **38**, 425-454.

LAUGHNAN J. R., GABAY S. J., 1975. An episomal basis for instability of S male-sterility in maize and some implications for plant breeding, in « Genetics and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts », édit. BIRKY *et al.*, Ohio State University.

LE GUEN J. *et al.* (à paraître).

LEVINGS III C. S., PRING D. R., 1977. Diversity of mitochondrial genomes among normal cytoplasms of maize. *J. Hered.*, **68** (6), 350-354.

LEVINGS III C. S., PRING D. R., 1978. The mitochondrial genome of higher plants. *Stadler, Genet. Symp.*, **10**, 77-93.

PICARD G., 1971. Un cas de stérilité femelle chez *Drosophila melanogaster*, lié à un agent transmis maternellement. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **272**, Série D, 2482-2487.

PICARD G., 1976. Non mendelian female sterility in *Drosophila melanogaster:* Hereditary transmission of I factor. *Genetics*, **83**, 107-123.

PRING D. R. and LEVINGS III, C. S., 1978. Heterogeneity of maize cytoplasmic genomes among male-sterile cytoplasms. *Genetics*, **89**, 121-136.

QUETIER F. and VEDEL F., 1977. — Heterogeneous population of mitochondrial DNA molecules in higher plants. *Nature*, **268**, 265-368.

SAINSARD A., CLAISSE M., BALMEFREZOL M., 1974. A nuclear mutation affecting structure and function of mitochondria in *Paramecium*. *Molec. gen. Genet.*, **130**, 113-125.

SINGH A., LAUGHNAN J. R., 1972. Instability of S male-sterile cytoplasm in maize. *Genetics*, **71**, 607-620.

SUBBARAO S. K., KRISHNAMURTHY B. S., CURTIS C. F., ADAK T. and CHANDRAHAS R. K., 1977, Segregation of cytoplasmic incompatibility properties in *Culex pipiens fatigans*. *Genetics*. **87**, 381-390.

THIELLEMENT H., 1977*a*. La stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* L. I. Historique et hypothèses. *Ann. Amélior. Plantes*, **27** (2), 203-209.

THIELLEMENT H., 1977*b*. La stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* L. II. Hétérogénéité phénotypique d'une lignée mâle-stérile. *Ann. Amélior. Plantes*, **27** (5), 547-553.

THIELLEMENT H., 1977*c*. La stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* L. III. Hérédité des phénotypes polliniques. *Ann. Amélior. Plantes*, **27** (5), 555-562.

THIELLEMENT H., 1978. Sur la réversion somatique de la stérilité mâle nucléo-cytoplasmique chez *Vicia faba* L. *C. R. Acad. Sci.* Paris, **287**, Série D, 29-32.

THIELLEMENT H., 1979. Sur quelques descendances de plantes présentant simultanément deux phénotypes polliniques à déterminisme non mendélien chez *Vicia faba* L. *C. R. Acad. Sci.* Paris, **288**, Série D, 827-833.

Ann. Amélior. Plantes, 1980, **30** (2), 123-132.

Cytoplasmic male sterility in *Vicia faba* L. V. — Intermediate phenotypes

H. THIELLEMENT

Laboratoire d'Amélioration des Plantes, I.N.R.A., Université de Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex

Summary

In this study we observed the F_{12} generation, the fourth successive generation in greenhouse conditions, of a cytoplasmic male-sterile line. Between the plants classified as I (for Intermediate pollen phenotype) variability is large. Among them, the plants showing flowers with black stamens and no pollen, and little pollen on other stamens, "SnI" plants, gave a progeny globally less fertile than I plants not showing black stamen, "classical I" plants. In the progeny of SnI plants, 6 plants were found to be fully male sterile with every stamen black and no pollen on all the observed flowers, phenotypically different from the original S (male sterile) plants.

Grouping the progenies according to the phenotype of the ancestor BC_8 plant, I or SVI (sterile towards intermediate) a third generation effect was visible, analogous to the grand-mother effect previously reported.

The different proportions of plant phenotypes are compared in I progenies in F_{10}, F_{11} and F_{12}. A slight evolution is noted towards fertility in F_{12} progenies from classical I plants.

These results are discussed according to the two plasmons hypothesis and can be interpretated by it at a global, population level. However the hypothesis does not fit for individual progenies and this leads to the question of its validity.

Introduction

Cytoplasmic male-sterility in faba beans has been extensively studied in England (Bond *et al.*, 1966 *a* & *b*) and in France (Berthelem, 1970; Picard, 1972; Berthelem & Le Guen, 1974; Thiellement, 1977 *a*, *b* & *c*, 1978, 1979 *a* & *b*; Duc, 1978) since it would enable the production of first generation hybrid varieties which would enhance and regularize yield of this protein crop. The lack of stability of the pollen sterility, which is due to an interaction between nuclear and cytoplasmic determinants constitutes the major agronomic problem.

Earlier we rewieved (Thiellement, 1977 *a*) the three peculiarities associated with the "447" cytoplasm discovered by Bond in 1957 *i.e.* instability, somatic reversion and permanent restoration. The different hypotheses were also discussed.

Previous experiments lead to the following observations: (1) in a genetically homogeneous male sterile line (BC_9) considerable phenotypic heterogeneity is observed between and within plants, this is due partly to somatic reversion causing 46 p. 100 of the plants to show a more fertile (intermediate) phenotype. Each so called SVI (sterile towards intermediate) plant is affected independantly and all the tillers of one plant are affected simultaneously (THIELLEMENT, 1977 *b*); (2) these modifications of the phenotype reflect some hereditary changes since the different phenotypes gave different proportions of phenotypes in their offsprings (THIELLEMENT, 1977 *c*). In this F_{10} generation S (male-sterile) plants were found only in the progenies of S mother plants (63 p. 100). (3) In the F_{11} generation described in the precedent paper (THIELLEMENT, 1979 *b*) no further S plants were found, even from F_{10} S mother plants. We noticed a "grand-mother effect" in the progenies of F_{10} I plants i.e. different proportions of phenotypes were found depending upon the phenotype of the BC_9 ancestor plant. However, the segregation pattern was very similar in the progenies of I plants at the F_{10} and F_{11} generations, in contrast with the S plants, in our greenhouse conditions.

We report here observations on the F_{12} generation, from open pollinated F_{11} I plants.

Material and Methods

Material

The ninth back cross (BC_9) of the Ad 23 line (spring type of *Vicia faba minor* bred by BERTHELEM) on the "447" cytoplasm was provided by PICARD.

The open pollination of this BC_9 in isolation gave the F_{10} generation. The nine F_{10} I plants which gave seeds both by self pollination and open pollination gave the F_{11} generation. In this F_{11}, eleven I plants, arising from open pollination, were chosen and gave, by open pollination, the F_{12} plants studied in this paper. This genealogy is presented in figure 1.

Phenotypic determination

As previously described (THIELLEMENT, 1977 *b*, 1979 *b*), we define by visual observation three flower phenotypes:

— S, for male-sterile with no pollen and grey-brown shrunken stamens;

— F, for male-fertile with abundant white pollen and usually black stamens, and;

— I, for intermediate, any observation not entering the two preceding classes, ranging from very little pollen to yellow pollen with grey-brown stamens.

Since one plant can present different flower phenotypes, we noted:

— S, I or F the plants with the same phenotype at each observation;

— SVI (stérile vers intermédiaire) or IVF (intermédiaire vers fertile) the plants showing on their different tillers the S ("pre" sectors) then the I ("post" sectors) phenotype and the I then the F phenotype respectively. The phenotypic modification (gradual somatic reversion) takes place at the same time on all the tillers of one plant;

— X plants are those with different phenotypes on different tillers such as I/F with a I main tiller and one or several F secondary tillers.

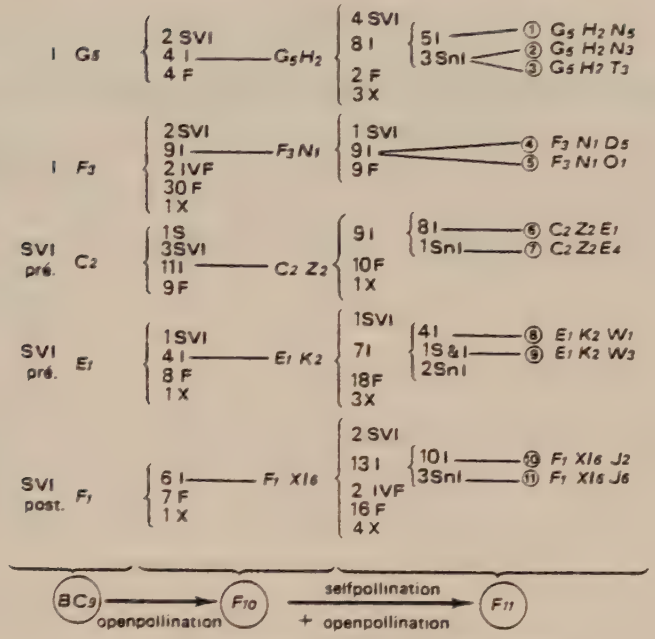


FIG. 1. — *Genealogy of the F_{11} mother plants*

In the past we also grouped a phenotype which has black stamens and no pollen in the I class. Noted "*Sn*" (stérile noir) this phenotype was taken as I since most of the time not every stamen of one flower was black, the others being grey brown with little pollen *i.e.* I stamens. When all the stamens are black, the flower next in the inflorescence or the flowers of the upper or lower nodes were "classical I".

However, since only a part of the I plants are able to self pollinate as tested in F_{10}, we chose to study the offpsring of 4 I plants frequently showing the *Sn* phenotype. The progenies of those "*Sn*I" plants are compared with the progenies of their "classical I" sister plants.

Another atypical plant, noted "S & I", was retained, which showed alternatively but with no regularity, the S and the I phenotypes.

The eleven F_{11} mother plants, the open pollinated progeny of which is presented in this paper, are described in figure 1.

Results

1. — *Variability among I phenotypes* (*table* 1)

There is a great variability between each "classical I" plant, as shown by the contribution they give to each phenotypic class in their progeny (see table 1, lines 1, 4, 5, 6, 8, 10). The same feature was previously observed in the BC_9 I plant progenies (THIELLEMENT, 1977 *c*).

TABLE I

Progenies from F_{11} I plants

Mother plants (phenotype)	F_{12} phenotypes					Number of F_{12} plants
	SVI	I (*Sn*I)	IVF	F	X	
(1) G5H2N5 (I)	—	5	—	14	1	20
(2) G5H2N3 (*Sn*I)	10	26 (5)	—	12	4	52
(3) G5H2T3 (*Sn*I)	4	25	—	4	3	36
(4) F3N1D5 (I)	—	7	—	7	2	16
(5) F3N1O1 (I)	—	3	—	13	—	16
(6) C2Z2E1 (I)	1	16	—	—	1	18
(7) C2Z2E4 (*Sn*I)	4	21 (17)	—	10	1	36
(8) E1K2W1 (I)	—	2	—	14	—	16
(9) E1K2X3 (S & I)	1	9	1	12	1	24
(10) F1XI6J2 (I)	—	6 (1)	—	10	2	18
(11) F1X16J6 (*Sn*I)	1	6 (6)	—	25	10	42
(12) TOTAL I No.	1	39 (1)	—	58	6	104
(12) TOTAL I Freq.	.01	.37	.00	.56	.06	
(13) TOTAL *Sn*I No.	19	78 (28)	—	51	18	166
(13) TOTAL *Sn*I Freq.	.11	.47	.00	.31	.11	
(14) TOTAL No.	21	126 (29)	1	121	25	294
(14) TOTAL Freq.	.07	.43	—	.41	.09	

The phenotypes are described in the "Material & Methods" section. The F_{12} plants showing *Sn* or SnI phenotypes are indicated in brackets in the I column.

Among them, the C2Z2E1 plant (6) is remarkable since it is the only mother plant with no F progeny, whereas the mean percentage of F plants in a I offspring is between 40 and 50 p. 100 (see below table 3). The only SVI plant in these "classical I" progenies also originated from this mother plant.

The S & I plant E1K2X3 (9) gave every kind of phenotype (except *Sn*I) and, even if it is the only one furnishing an IVF plant, the proportions of the different phenotypes are very like an I progeny.

Grouping the progenies of the *Sn*I plants (line 13) to compare them with the classical I progenies (line 12), we tested the identity of the two distributions by

a χ^2 test. The p value obtained in a 2×4 table is below 0.01. It is therefore clear that the S*n*I phenotype is different from the classical I. However, once again the variability between each S*n*I mother plant should be noted. One can observe the differential contributions of the plants (2), (3) and (7) on the one hand, with numerous SVI and I plants and the plant (11) on the other hand, with numerous F plants.

S*n*I plants are found in these progenies (number in brackets in the I column of table 1). All, except one, came from S*n*I mothers. The S*n*I plant (3) did not furnish any S*n*I progeny. The I class of the S*n*I plant (11) is entirely constituted by S*n*I plants.

2. — *A new male sterile phenotype*

Of the 29 S*n*I plants found in F_{12}, six were fully male-sterile *i.e.* all the flowers observed (about forty per plant) had every stamen black and no pollen.

This new plant phenotype, homogeneous S*n*, is observed in 3 plants from C2Z2E4 (7), 2 from G5H2N2 (2) and 1 from F1XI6J6 (11). The S*n* plants are thus found only in the progeny of S*n*I plants.

3. — *A third generation effect (table 2)*

In a previous paper (THIELLEMENT 1979 *b*) we found, comparing the progenies of 4 I from I plants with those of 5 I from SVI plants, what has been called a "grand-mother effect". That is different proportions of phenotypes were found according to the phenotype of the grand-mother plant, a more fertile F_{11} progeny occuring more often when the F_{10} I plant was from a BC_9 SVI plant than when the F_{10} I was from a BC_9 I plant.

We tested on these F_{12} offsprings whether it was still noticable one generation later. For this purpose the progenies of F_{11} plants from the BC_9 I plants G5 and F3 were compared with the progenies of F_{11} plants from the BC_9 SVI plants C2, E1 and F1.

The χ^2 test performed on a 2×4 table gives a $0.10 > p > 0.05$ and comparing SVI + I and IVF + F classes (contingency table 2×2) $0.05 > p > 0.02$. Thus

TABLE 2

F_{12} progenies according to their BC_9 ancestor

Phenotypic genealogy (number of plants)			F_{12} phenotypes					Number of F_{12} plants
BC_9	F_{10}	F_{11}	SVI	I	IVF	F	X	
I (2)	I (2)	I + S*n*I (5)	14	66	0	50	10	140
SVI (3)	I (3)	I + S*n*I + S × I (6)	7	60	1	71	15	164

The phenotypes are described in the text.

the probability values are similar to those found in the previous generation and once again a more fertile progeny arises more often from SVI ancestors than from I ancestors.

4. — *Comparison of phenotypic frequencies between generations (table 3)*

As pointed out in the introduction, we found in F_{11} progenies the same proportions of phenotypes as those found in F_{10}, in both cases from I mother plants. This result is contradictory with the S progenies where we noticed such a shift

TABLE 3

Phenotypic frequencies of I progenies in F_{10}, F_{11} and F_{12} generations

I mother plants (number)	Phenotypic frequencies					Number of plants in progeny
	SVI	I	IVF	F	X	
BC_9 (6)	.10	.33	.04	.50	.03	90
F_{10} (9)	.07	.32	.01	.48	.12	142
F_{11} (6)	.01	.37	.00	.56	.06	104

Only the classical I plants are considered in F_{11}. The phenotypes are described in the text.

that no further S plants were seen in F_{11}. In table 3 are given the phenotypic frequencies observed in F_{10}, F_{11} and F_{12}. Only the F_{12} progeny arising from classical I mother plants is considered, since in the previous generation only F_{10} I plants able to selfpollinate (i.e. not S*n*I plants) were chosen.

The χ^2 test is performed first comparing the number of plants in the SVI, I, IVF + F and X classes, in a 4 × 3 table, giving a $0.02 > p > 0.01$. Thus, at least two among the three distributions are different. However, comparing SVI + I and IVF + F classes in a 2 × 3 table, these three distributions are very similar ($0.90 > p > 0.75$).

The IVF class has always been the rarest. The discrepancy observed between the two methods of calculation is thus mainly explained by the decrease of the SVI class from 10 p. 100 to 7 p. 100 then to 1. p 100.

Interpretation - Discussion

Heterogeneity among I phenotypes is demonstrated by comparing the progenies from S*n*I plants and from classical I plants (table 1). The working hypothesis of cytoplasmic heterogeneity, where two kinds of plasmons -S and F- coexist in different proportions in each plant, may explain this result.

Somatic segretations may be supposed to be frequent in female gametogenesis since different phenotypes occur in the progeny. If they occur at random, the proportions of plant phenotypes in the progeny could reflect in some way the mean proportions of the two different plasmons in the mother plant's cells, at the

time when ovules are formed. The less frequent occurence of F plants in S*n*I progenies may reflect their higher proportions of S plasmons, as compared to their classical I sister plants. The more frequent occurence of SVI plants from S*n*I mothers has the same interpretation.

The third generation effect on this F_{12} (table 2) may be explained in the same way as the grand mother effect on the F_{11}, mainly by a greater "instability potential" in plants arising from an SVI ancestor. The phenotypic shift from S to I is, on our hypothesis the manifestation of the progressive overcoming of the S by the F plasmons. The I phenotype in these SVI plants is a transient state where variation continues, since I (post) sectors gave a globally more fertile progeny than the homogeneous I sister plants. Two generations later, the same instable cytoplasmic state leads to the same effect, a higher proportion of L plants arising from SVI ancestor. One may point out, following this idea, that the rare IVF plants were found in F_{11} (THIELLEMENT, 1979 *b*) and in F_{12} (table 1) in I progenies with SVI ancestor plants. In other words, plants coming from SVI ancestor may still have an evolving cytoplasm where F plasmons continue to overcome S plasmons more quickly than in plants from I ancestors.

The phenotypic frequencies of the I progenies in F_{10}, F_{11} and F_{12} are similar only when (1) grouping the SVI and the I classes and (2) by taking into account only the classical I F_{11} mother plants (table 3). This method of calculation has a biological meaning since (1) progenies from SVI plants (cummulated pre and post offsprings) and from I plants had the same phenotypic frequencies in F_{10} (THIELLEMENT, 1977 *c*) and since (2) only the I plants able to selfpollinate (not S*n*I plants) gave the F_{11} progenies.

Nevertheless, an evolution can be noted concerning the SVI and the F classes in F_{12} (table 3). On our hypothesis, the explanation is a progressive decrease of the mean proportions of S plasmons, with a correlative increase of the F plasmons, in classical I plants. Thus we can not consider I progenies to be similar between generations. As in the S genealogy from BC_9 to F_{11}, a progressive shift is noted towards fertility in the I genealogy from BC_9 to F_{12}. However, if it was true for every S plant, it is not the case here since S*n*I plants are globally less fertile and may even provide fully male sterile plants.

Since we define the cytoplasmic composition of the plants by the phenotypes found in their progeny, we try in figure 2 to represent the genealogy of the F_{11} plants from the BC_9. Each plant is described by its percentage of F plants in the progeny as it is considered to be related to its proportions of F plasmons.

F_{11} classical I plants can be described by between 0 p. 100 (6) and 88 p. 100 (8)

BC_9	F_{10}	F_{11}
I-40 %	→ I-12 % →	(1) I-70 % (2) S*n*I-23 % (3) S*n*I-11 %
I-68 %	→ I-47 % →	(4) I-44 % (5) I-81 %
SVIpre-46 %	→ I-50 % →	(6) I-0 % (7) S*n*I-28 %
SVIpre-57 %	→ I-62 % →	(8) I-88 % (9) S & I-50 %
SVIpost-50 %	→ I-43 % →	(10) I-56 % (11) S*n*I-60 %

FIG. 2. — *Description of mother plants by their percentage of F [redacted] progeny. Genealogy.*

F plants, and S*n*I plants by between 11 p. 100 (3) and 60 p. 100 (11) F plants. This large variance within each class, already noted in the Results section, seems contradictory with the explanations given above for their phenotypic differences.

The unstable state supposed in the SVI genealogy of the last line is not evident with 50 p. 100 to 43 p. 100 to 56 p. 100. And in contrast, the first line with 40 p. 100 to 12 p. 100 to 70 p. 100 is much more variable, although it is supposed to be less unstable (I genealogy).

Almost every plant and every genealogy appear to be exceptions to the rules suggested above. Therefore, the laws deduced at a global level can not help to understand any one individual progeny.

The main explanation that can be suggested to resolve this discrepancy is that we are dealing here with a chance phenomenon. The occurence of phenotypes depends upon somatic segregations which occur at random, at least during female gametogenesis. The weak multiplication coefficient of faba beans is indeed a barrier to the genetical understanding of such a phenomenon, and it is only by summing individual progenies that segregation laws are deductible. However, some plants can provide rather numerous progenies, as the S*n*I plants studied in this paper, with at least 36 plants per progeny. We thus must find, in large offsprings, frequency values closed to the means. In the present data, it is not the case.

Since we do not yet have the offspring of F_{12} S*n* plants, it is premature to discuss them. Nevertheless one can suggest, by their occurence only in S*n*I progenies, that may be a new event, correlated or not with the intermediate fertility phenotype, takes place or is revealed in those plants.

Conclusion

Heterogeneity is demonstrated within the I class of phenotypes. The segregation patterns are different between 4 S*n*I and 6 classical I progenies. An ancestor effect is still visible two generations later, the F_{12} is globally more fertile when from BC_9 SVI plants than when from BC_9 I plants. An evolution can be noted between classical I progenies at different generations, *i.e.* in F_{12} a slight shift towards fertility. In S*n*I progenies, 6 fully male sterile plants were found with a new phenotype S*n* (black stamens).

Previously suggested rules of transmission, on the two plasmons hypothesis, may explain these results at a global, population level. However, they do not fit any individual genealogy.

Different kinds of experiments are needed and are presently in progress. The pollen phenotype may be too far, ontogenically, from the hypothetic cytoplasmic events, and this is also an explanation for the departure of individual progenies from the global laws, biochemical markers of cytoplasmic states may help to clarify this idea.

The definition and classification of phenotypes are obtained from their progeny. Other methods, such as multivariate analyses, may provide new directions for the interpretations.

Theoretical work which might provide a better fit of the results to the hypothesis is also needed. There are many possible approaches: one may suggest for instance new types of plasmons, recombined or mutant for example, leading perhaps to homoplasmon I plants or the new S*n* phenotype.

In any case, the fact that laws deduced from global analysis can not be applied to individuals may well explain the failure of all selection programmes dealing with cytoplasmic male sterility in faba beans.

Nevertheless, the new male sterile phenotype must be studied further to determine if, by chance, a new stable male sterile form can be obtained.

Reçu pour publication en juillet 1979.

Aknowledgements

The financial support was provided by A.M.S.O.L. Proteagineux. Thanks are due to many colleagues with who this paper was discussed and especially Felicity VEAR for her help in english.

Addendum

Since this paper has been sent for publication, a new generation has been studied. The S*n* phenotype is inherited but in the same instable way than other phenotypes. Frequencies of the F_{13} phenotypes confirm that indeed the two plasmons hypothesis is no more valid. A new explanation, lying also on cytoplasmic heterogeneity, has been proposed (THIELLEMENT, 1980) and will be published.

Résumé

La stérilité mâle cytoplasmique chez Vicia faba *L.*
V. — Phénotypes intermédiaires

Cette étude porte sur la F_{12}, quatrième génération en conditions de serre d'une lignée mâle stérile cytoplasmique. On met en évidence une hétérogénéité parmi les plantes I (intermédiaire) (tabl. 1). Parmi elles, les plantes S*n*I (qui présente le phénotype S*n*, étamines noires sans pollen, associé au phénotype I, peu de pollen) fournissent une descendance globalement moins fertile que les plantes sœurs homogènes I. Dans la descendance des plantes S*n*I, on a trouvé 6 plantes S*n* homogènes, complètement mâle-stériles.

Lorsque l'on compare les proportions des descendants des plantes F_{11} selon le phénotype I ou SVI de leur ancêtre maternel du BC_9, on trouve un effet à la troisième génération (tabl. 2) analogue à l'effet grand-mère précédemment décrit.

Dans le tableau 3, sont comparées les fréquences de phénotypes dans les descendances de plantes I du BC_9, de la F_{10} et de la F_{11}. On constate une lègère évolution vers la fertilité (décroissance de la classe SVI, croissance de la classe F) dans ces descendances de plantes I classiques.

Considérés globalement, au niveau population, ces résultats peuvent s'interpréter par l'hypothèse de deux cytoplasmones en proportions variables. Cependant on ne peut appliquer ces lois aux descendances et généalogies individuelles. Ceci pose la question de la validité de l'hypothèse.

References

BERTHELEM P., 1970. *Rapport d'activité de la Station d'Amélioration des Plantes de Rennes*, 1968-1970, I.N.R.A.

BERTHELEM P., LE GUEN J., 1974. *Rapport d'activité de la Station d'Amélioration des Plantes de Rennes*, 1971-1974, I.N.R.A.

BOND D. A., FYFE J. L., TOYNBEE-CLARKE G., 1966*a*. Male-sterility in field beans. III. Male-sterility with a cytoplasmic type of inheritance. *J. agric. Sci.*, Camb. **66**, 359-367.

BOND D. A., FYFE J. L., TOYNBEE-CLARKE G., 1966*b*. Male-sterility in field beans. IV. Use of cytoplasmic male-sterility in the production of F1 hybrids, and their performance in trials. *J. agric. Sci.*, Camb. **66**, 369-377.

DUC G., 1978. *Modalités d'expression et hypothèses explicatives du manque de stabilité de la stérilité mâle cytoplasmique de la féverole* (Vicia faba *L.*). Thèse Dr Ing. Université de Paris-Sud, 59 p.

PICARD J., 1972. — Rapport d'activité de la Station d'Amélioration des Plantes de Dijon, 1968-1972, I.N.R.A.

THIELLEMENT H., 1977*a*. La stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* L.I. Historique et hypothèses. *Ann. Amélior. Plantes*, **27**, 203-209.

THIELLEMENT H., 1977*b*. La stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* L.II. Hétérogénéité phénotypique d'une lignée mâle-stérile. *Ann. Amélior. Plantes*, **27**, 547-553.

THIELLEMENT H., 1977*c*. La stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* L.III. Hérédité des phénotypes polliniques. *Ann. Amélior. Plantes*, **27**, 555-562.

THIELLEMENT H., 1978. Sur la réversion somatique de la stérilité mâle nucléo-cytoplasmique chez *Vicia faba* L. *C.R. Acad. Sci.* Paris, **287**, Série D, 29-32.

THIELLEMENT H., 1979*a*. Sur quelques descendances de plantes présentant simultanément deux phénotypes polliniques, à déterminisme non-mendélien, chez *Vicia faba* L. *C.R. Acad. Sci.* Paris, **288**, Série D, 827-830.

THIELLEMENT H., 1979*b*. Cytoplasmic male sterility in *Vicia faba* L. IV. A grand mother effect. *Ann. Amélior. Plantes*, **29** (2), 163-171.

THIELLEMENT H., 1980. *Mémoire sur les Travaux*. Concours chargé de Recherches I.N.R.A.

CYTOPLASMIC MALE STERILITY IN VICIA FABA L.
part 6.GENETICAL ARGUMENTS FOR CYTOPLASMIC HETEROGENEITY.

H.Thiellement

soumis à Theoret.Appl.Genetics

Summary. In many higher plants, nucleo-cytoplasmic interactions lead to pollen abortion. In Vicia faba, cytoplasmic male sterility is unstable where the cytoplasm appears to shift from a sterile to a fertile state. We define three then five flower phenotypes and focus our study on the progenies obtained from intermediate, i.e. semi-sterile, plants during five successive generations in the same homozygous nuclear constitution. The results could be interpretated by quantitative modifications of at least four different kind of cytoplasmic determinants.

Key words : Vicia faba - cytoplasmic male sterility - cytoplasmic inheritance - plasmon

Introduction

Nucleo-cytoplasmic male sterility is frequently encountered in higher plants (Edwardson 1970, Laser and Lersten 1972). It has been been found in Vicia faba by Bond in 1957. According to several authors (Bond et al. 1966, Berthelem 1970, Picard 1972, Berthelem and Le Guen 1974) the cytoplasm, called "447", presents three peculiarities. First, appearance of male fertility can be somatic where one plant shows different phenotypes on different sectors, it is called "somatic reversion". Second, "447" cytoplasm is unstable and gives rise to male fertile plants in the

progenies of crosses between cytoplasmic male sterile (cms) and maintainer lines (maintainer for male sterility, no restorer factors in the genotype). Third, the restoration is "permanent" and is due to one dominant Rf "major" gene. One quarter male sterile plants are expected in the F2 of the hybrid between cms and restorer lines, but nearly all F2 plants are fertile with the frequency of exceptions ranging from none to 3 out of 700, according to Bond et al. (1966).

Pollen from fertile plants or fertile sectors of plants described in the first two cases, and from about one quarter of the F2 plants of the third case, give te same offspring as a maintainer when tested on a cms line. Since this fact excludes a nuclear mutation from rf to Rf, the three peculiarities could be, therefore, interpretated as a cytoplasmic modification from a sterile to a fertile state.

We choose to study the instability of the male sterile phenotype in a cms line. To avoid, or at least minimize, nuclear determinants, the observations and experiments were performed from a ninth back-cross, i.e. in a supposed homozigous nuclear state. The definition of three, ~~and~~ and later five, flower phenotypes, and the segregation patterns along the generations provide good agreement with our working hypothesis of cytoplasmic heterogeneity (Thiellement 1977 a).

In this paper, after recalling in the next section the previously published experiments (see below, Material Methods-Generations), we report the results obtained after five generations from the ninth back-cross (BC9 to F'3). A more precise interpretation is then proposed where the male sterile phenotype is the reflect of a cytoplasmic state which is defined by variable amounts of at least four kinds of cytoplasmic determinants, i.e. a four plasmons hypothesis.

Material and Methods

Material. The ninth back-cross (BC9) of a spring type of faba bean "Ad23", bred by Berthelem, on the "447" cytoplasm was provided to us by Picard (I.N.R.A.).

Classificaton of flower phenotypes. The phenotypes are defined by visual observation of the mature, unopened flowers : "S" for male-sterile with no pollen detectable and shrunken grey-brown stamens; "F" for male-fertile with abundant white pollen and usually black stamens; "I" for intermediate, semi-sterile flowers not classifiable as S or F. In addition, since the F'1 generation, we take into account another flower phenotype, which is black stamens

with no pollen. Noted "Sn" (sterile noir), this phenotype was previously grouped in the I class since, most of the time, not every stamen was black, the others being grey-brown with few yellow pollen, i.e. "classical I" stamens. Or, when all the stamens are black, this Sn flower is associated in the same inflorescence with I flowers.

Classification of plant phenotypes. Flowers on each tiller of each plant were observed approximately each week during the flowering period. Since one plant can present different phenotypes, we recorded : (1) an "S","I", or "F" for a plant showing the same flower phenotype on all the tillers throughout the flowering period. (2) "SVI" for a plant showing a sterile to intermediate phenotype for all the tillers simultaneously. (3) "IVF" for plants with intermediate to fertile flowers and (4) an "X" for plants with different tillers having different phenotypes , eg. "S/F" denotes a plant with an S main tiller and an F for one or more secondary tillers. Among I plants, and since the F11 generation, the plants showing frequently Sn stamens are recorded "SnI" and the ones showing only Sn stamens are denoted "Sn".

Growth conditions. The seeds are sterilized then sown in multipots. The plantlets are pricked cut in greenhouse and spaced 0,6m between the rows and 0,4m within a row, allowing individual observations and favouring the tillering of the plants. The photoperiod of the greenhouse is 16 hours.

Generations. BC9 displayed considerable phenotypic heterogeneity both between and within plants (Thiellement 1977b). Of 146 plants, 36% were classifiable as S, 42% as SVI, 19% as I and 3% as F. Of particular interest were the numerous SVI plants, showing simultaneously on the different tillers the S then the I phenotype, each SVI plant independently.

The F10 was obtained by freepollination of the BC9 plants in isolation. The seeds were harvested separately at each node of each tiller of each plant. As shown in Table 1 (from Thiellement 1977c), the different mother plants gave different proportions of phenotypes in progeny, at least as concern S, I and F BC9 plants. The progeny of SVI plants were subdivided into that derived from S sectors and that from I sectors of the plants. In the Table 2 are compared the progenies from S and from I sectors of the SVI plants wich provided both types of offsprings (4 BC9 plant), and indeed, they gave different proportions of the different phenotypes. Therefore, it has been concluded that the phenotypic heterogeneity observed in the BC9 is due, at

TABLE 1

F_{10}:Progenies of BC_9 plants - Frequencies of the different plant phenotypes.

BC_9 mother plants (number)	Phenotypes						Number of F_{10} plants
	S	SVI	I	IVF	F	X	
$S_{(8)}$	.63	.13	.04	.00	.18	.02	45
S sectors of $SVI_{(5)}$	.02	.14	.41	.00	.41	.02	51
$I_{(6)}$	.00	.10	.33	.04	.50	.03	90
I sectors of $SVI_{(9)}$	.00	.06	.30	.00	.58	.06	77
$F_{(2)}$	.00	.00	.00	.00	1.00	.00	24

TABLE 2

F_{10}:Progenies of the 4 BC_9 SVI plants with offsprings from S and from I sectors.Number of plants.

Phenotypes	S	SVI+I	F
S sectors	1	23	13
I sectors	0	8	22

least in part, to genetical modifications. Moreover, the homozygcus state of a BC9 line, the somatic manifestation (SVI) as well as the frequency of the phenomenon exclude a nuclear mutation from a maintainer to a restorer condition. And, as suggested in the introduction section, we assume that we are dealing here with modifications of cytoplasmic determinants.

In the F11 generation (Thiellement 1979 b), (1) no more S plants were found, even from F10 S (i.e. S from S) plants; (2) no pollen effect was detectable since F10 S plants gave the same progeny as freely pollinated or crossed by F from S sister plants, and since F10 I plants gave the same progeny as freely pollinated or selfpollinated; (3) we observed a "grand-mother effect" at two levels : first, F10 I plants have a higher probability to give a more fertile progeny when derived from BC9 SVI plants than when derived from BC9 I plants (see Table 3); second, the X plants with F and I tillers, when from S plants (X from S) gave a progeny entirely fertile but when from I phenotypes (X from I) the I tillers gave a segregating (I,F,X) progeny (see Table 4, from Thiellement 1979a).

In the F12 generation (Thiellement 1980) we try to estimate heterogeneity inside the I class. For this purpose, we choose the F11 plants showing frequently the Sn phenotype, i.e. SnI plants, and compare their progeny to the ones furnished by F11 classical I sister plants, freely pollinated in isolation. As chown in Table 5, SnI plants

TABLE 3

F_{11}:A grand mother effect-Progenies of I plants from I and from SVI plants-Frequencies of the different plant phenotypes.

I mother plants (number)	Phenotypes S	SVI	I	IVF	F	X	Number of F_{11} plants
I from I (4)	.00	.12	.40	.00	.38	.10	52
I from SVI (5)	.00	.05	.27	.02	.53	.13	91

TABLE 4

A grand mother effect-Progenies of X plants from S and from I plants-Frequencies of the different plant phenotypes.

X mother plants (number)		Phenotypes S	SVI	I	IVF	F	X	Number of plants
X ffom S (6)	I tillers	.00	.00	.00	.00	.99	.01	93
	F tillers	.00	.00	.00	.00	1.00	.00	99
X from I (3)	I tillers	.00	.00	.33	.00	.50	.17	30
	F tillers	.00	.00	.01	.00	.99	.00	121

TABLE 5

F_{12}: Intermediate phenotypes-Progenies from I and from SnI sister plants-Frequencies of the different plant phenotypes

F_{11} mother plants (number)	Phenotypes SVI	I (Sn / SnI / I)	IVF	F	X	Number of F_{12} plants
SnI (4)	.11	.47 (.08/.28/.64)	.00	.31	.11	166
I (6)	.01	.37 (.00/.03/.97)	.00	.56	.06	104

TABLE 6

F_{12}: Intermediate phenotypes-Progenies from two groups of sister plants -Number of plants.

F_{11} mother plants (phenotype)	Phenotypes SVI	I	IVF	F	X	Number of plants
$G_5H_2N_5$ (I)	0	5	6	14	1	20
$G_5H_2N_3$ (SnI)	10	26	0	12	4	52
$C_2Z_2E_1$ (I)	1	16	0	0	1	18
$C_2Z_2E_4$ (SnI)	4	21	0	10	1	36

gave a globally less fertile progeny than I plants, when grouping the different mother plants. But, when individual progenies are observed, as exemplified by the two groups of plants in Table 6, this is not always the case. In this F'2, 6 plants were found showing only Sn flowers. Those Sn plants fully male-sterile but different from the S ones, originate only from SnI mothers. Moreover, many SnI plants were found from SnI mothers and very few from I mothers, suggesting this trait is inherited.

Results.

Here we report the observations made in the F'3 generation, obtained by free pollination in isolation of chosen F'2 plants.

'- Inheritance of the Sn phenotype.

To obtain information about heritability and stability of the new Sn phenotype, we sown the progenies of the 6 F'2 Sn plants and compare them to the ones furnished by their F'2 SnI or I sister plants. The results are reported in Table 7.

TABLE 7

F_{13}:Progenies from F_{12} Sn,SnI and I sister plants

F_{12}mother plants (phenotype)	Phenotypes					Number of plants
	SVI	I (Sn/SnI/ I)	IVF	F	X	
(1) $C_2Z_2E_4D_3$ (Sn)	0	4 (0/ 3/ 1)	1	20	2	27
(2) $C_2Z_2E_4E_3$ (Sn)	0	10 (0/ 8/ 2)	0	16	4	30
(3) $C_2Z_2E_4F_1$ (Sn)	0	18 (1/16/ 1)	0	3	6	27
(4) $C_2Z_2E_4F_5$ (I)	0	13 (0/ 9/ 4)	0	13	1	27
(5) $F_1XI_6J_6B_4$ (Sn)	0	17 (4/13/ 0)	1	11	1	27
(6) $F_1XI_6J_6C_3$ (SnI)	0	7 (0/ 7/ 0)	0	13	0	20
(7) $F_1XI_6J_6E_1$ (SnI)	0	19 (0/ 9/10)	0	9	2	30
(8) $G_5H_2N_3G_2$ (Sn)	0	14 (3/ 9/ 2)	0	6	3	23
(9) $G_5H_2N_3H_1$ (Sn)	0	8 (0/ 7/ 1)	0	6	1	15
(10) $G_5H_2N_3C_4$ (I)	0	13 (0/ 3/10)	0	10	0	23
(11) $G_5H_2N_3D_6$ (I)	0	14 (0/ 0/14)	0	14	3	31
Total Sn	0	71 (8/56/ 7)	2	62	17	152
Total SnI	0	26 (0/16/10)	0	22	2	50
Total I	0	40 (0/12/28)	0	37	4	81
Frequencies Sn	.00	.47 (.11/.79/.10)	.01	.41	.11	152
Frequencies SnI	.00	.52 (.00/.62/.38)	.00	.44	.04	50
Frequencies I	.00	.49 (.00/.30/.70)	.00	.46	.05	81

By summing the progenies from Sn, SnI and I F'2 mothers plants (three last lines of Table 7), two main remarks should be made : (1) no difference appears between the three groups of mother plants as concern the proportions of I, F, and X classes, at the opposite of the F'2 observations (see Table 5) and (2) the three phenotypic classes of mother plants gave different proportions of Sn, SnI and I plants in F'3 (inside the I class), providing evidence of the heritability of those phenotypes. This inheritance is of the same unstable kind than the other (I, S) phenotypes.

But, as in the previous generations, when looking at individual progenies, a large variance is seen within each phenotypic class. One can for instance look at the numerous F plants arising from Sn plant 1, as compared with the very few F plants coming from sister Sn plant 3.

2- A grand-mother effect in F'3.

We also investigate if F'2 classical I plants chosen in progenies of F'1 classical I plants differing by their segregation pattern can too be differentiated in F'3, i.e. to estimate another level of grand-mother effect. For this purpose, we choose two F'2 I plants from F'1 I plants which gave approximately the same amount of I and F plants on the one hand, and two F'2 I plants arising from an F'1 I plant with no F progeny on the other hand.

TABLE 8

F_{13}:Progenies from F_{12}I plants chosen ~~in~~ according to the segregation pattern of F_{11}I plants.Number of plants.

Genalogy F_{11}	F_{12}plants		F_{13}phenotypes I	F	X
$C_2Z_2E_1$ (I)	1 SVI, 16 I	$C_2Z_2E_1A_5$ (I)	17	3	0
	1 X	$C_2Z_2E_1A_2$ (I)	10	3	1
$F_3N_1D_5$	7 I, 7 F, 2 X	$F_3N_1D_5C_1$ (I)	9	6	1
$F_1XI_6J_2$	6 I, 10 F, 2 X	$F_1XI_6J_2C_6$ (I)	9	9	0

The results obtained are described in Table 8. When are compared the two kinds of progeny (C2 Z2 E1 A5 + C2 Z2 E1 A2 versus F3 N1 D5 C1 + F1 XI6 J2 C6) for I and F classes, they appear to be different (.o5 p .01). Thus we found here another level of grand-mother effect. In other words, inside the I class and inside the "classical I" phenotypes, heterogeneity exists that can be partly described by that inheritance of segregation pattern.

3- Evolution of phenotypic frequencies.

In the Table 9 are reported the phenotypic frequencies obtained in F10, F11, F12 and F13 which shows the evolution along the generations of the different progenies in the "classical I" genealogy. In the Table 10 are reported the phenotypic frequencies obtained in the I genealogy, i.e. grouping I, SnI and Sn plants.

In both tables, the SVI class decreases then disappears. The F class shows a relative stability or a weak decrease and the I class of phenotype increases.

TABLE 9

Evolution of phenotypic frequencies in the genealogy of "classical I" plants.

Generation (number of mother plants)	Phenotypes						Number of daughter plants
	S	SVI	I	IVF	F	X	
BC_9 (5)	.00	.11	.28	.05	.52	.04	80
F_{10} (9)	.00	.07	.32	.01	.48	.12	142
F_{11} (5)	.00	.01	.37	.00	.56	.06	104
F_{12} (7)	.00	.00	.57	.00	.39	.04	149

TABLE 10

Evolution of phenotypic frequencies in the genealogy of I plants (I + SnI + Sn).

Generation (number of mother plants)	Phenotypes						Number of daughter plants
	S	SVI	I	IVF	F	X	
BC_9 (6)	.00	.10	.33	.04	.50	.03	90
F_{10} (9)	.00	.07	.32	.01	.48	.12	142
F_{11} (11)	.00	.07	.43	e	.41	.09	294
F_{12} (15)	.00	.00	.52	e	.41	.07	349

Discussion.

Instability of cms has been described in maize (Singh and Laughnan 1972, Laughnan and Gabay 1973), in pearl millet (Burton 1972, 1977; Clement 1975) and in sunflower (Leclercq 1971, 1979; Vear 1980). For cms-S in maize as for the Heliantus petiolaris source in sunflower, the genetical analysis, dealing mostly with newly arisen restorated condition, lead the authors (Laughnan and Gabay 1975, Vear 1980) to hypothesize the involvement of an episomial element. This F-episome, free in the cytoplasm (male sterile form) may move as well into organellar DNA (mt-DNA) as suggest by biochemical analysis (Levings et al. 1980) as into nuclear DNA, defining two different pattern of genetical determinism - cytoplasmic or mendelian.

In these species two pollen phenotypes are considered-male sterile and male fertile - and is discussed a sudden and random event, as in pearl millet where Clement (1975) hypothesize a plasmon mutation.

In Vicia faba, the occurence of intermediate phenotypes as well as the phenotypic modification occuring simultaneously on different tillers of one plant (the SVI and IVF plants) lead us to prefer a working hypothesis of cytoplasmic heterogeneity (Thiellement 1977a) . That kind of hypothesis has been also developped by Demarly (1974).

As in other plant species, the pollen phenotype is defined in faba beans by nucleo-cytoplasmic interactions. To avoid the nuclear part of this determinism, we choose to work with nuclear homogeneity (supposed homozygosity of a ninth back-cross).

The extent of the phenotypic heterogeneity at the EC9 level and after, together with the features of the somatic reversion (the SVI phenomenon) does not appear to be relevant with a reverse mutation from rf to Rf. Indirect evidence is also provided in F11 (Thiellement 1979b) since no pollen effect was observed, which can also exclude a nuclear unstable system. We assume that we are dealing here with genetical modifications occuring at the cytoplasmic level. We define three, then five, pollen phenotypes allowing us to a genetical analysis, but the phenomenon is quantitative. For that reason, we suggest that "cytoplasmic states" leading to pollen phenotypes are due to relative quantities of cytoplasmic determinants-plasmons- among which a selection pressure is acting towards male fertility.

Since an I phenotype may arise from an F phenotype, by somatic (F/I plants of the X class) or generative ways (I plant from F sectors, Table 4), it seems difficult to explain the phenomenon by one kind of plasmon, virus or "M" agent (Bond et al. 1966; Edwardson et al. 1976).

With two plasmons-S and F- we can explain (Thiellement 1977c) the phenotypic heterogeneity of the EC9 and its heredity in F10. The I phenotype is supposed to be due to a mixture of S and F and then, the SVI phenomenon reflects the evolution of F plasmons, overcoming the S ones. Somatic segregations may be frequent in X plants as well as in female gametogenesis, leading to daughter plants differing in phenotype with their mother. The grand-mother effect in F11 (Table 3) is thus depending upon an "instability potential" more important in I from SVI plants than from I plants (Thiellement 1979b).

To provide explanation for SnI and I F11 plants differing by their F12 progeny (Table 5, Thiellement 1980), one may admit that in SnI plants the S/F ratio is higher than in sister I plants. This is contradictory with individual offsprings (Table 6) where an SnI plant can provide numerous F progenies and an I plant none. This is also in contradiction with the above reported F13 results (Table 7) where Sn, SnI and I F12 plants gave the same proportions of SVI, I, F and X progenies.

Looking at the evolution of phenotypic frequencies in I genealogy (Tables 9 and 10), the progressive decrease of the SVI class is not correlated with an increase of the F class. Therefore, less S plasmons does not mean more F ones.

With the assumption, provided by data presented in Table 7, that the pollen phenotypes Sn an SnI are inherited, we suggest that two more kinds of plasmons are involved : (1) Sr, for remodeled S plasmon with a selective value close to the F one, higher than the S one; and (2) Srn, with the same characteristics of selective value and which is involved in the manifestation of the Sn and SnI phenotypes.

According to these considerations, the I phenotype may result from different cytoplasmic mixtures such as [S, F], [S, Sr, F], [S, Srn, Sr, F], [Srn, Sr, F], [Srn, F] when are noted in brackets the major classes of plasmons. This can explain the great variability between progenies from I plants, as well as the stability of some of them. Along the I generations (Table 9 and 10), the Sr and Srn plasmons increase in quantities, overcoming the S ones : SVI decrease, I increase and F remain the same. The grand-mother effect is explained by the fact that I from SVI plants as well as X from S plants (Table 3 and 4) are mostly [S, F] mixtures, where F plasmons overcome easily the S ones. Accordingly, I from I plants and X from I plants have, most of the times, [S, Sr, F] cytoplasmic constitution where selection pressure is weak on Sr and not so strong on S since more plasmons are involved. F'1 SnI plants may have [S, Sr, Srn, F] cytoplasmic components when F'1 "classical I" plants have mostly [Sr, F] with no more SVI progenies (Table 5). One generation later, F'2 SnI and F'2 Sn plants can be described [Sr, Srn, F] when "classical I" plants

being [Sr, F] with no SVI progeny neither from I nor from SnI and Sn (Table 7). The selection towards elimination of S plasmons is supposed less easy when more plasmons are invclved.

What can be the molecular basis of those plasmons ? This point is still puzzling, even in the best studied cases of cms. Arguments have been developped which suggest the involvement of mitochondria in maize (Miller and Koeppe 1971, Warmke and Lee 1977, Forde et al. 1978, and others) and more precisely mt-DNA in maize (Levings and Pring 1976, 1978), in wheat (Quetier and Vedel 1977), in Nicotiana (Belliard et al. 1979) and in sorghum (Pring et al. 1980). Other arguments indicate a chloroplastic localisation as in barley (Ahokas 1978) or in Gossypium and Nicotiana (Chen and Meyer 1979). In other systems, as yet suggested for Vicia faba (Edwardson et al. 1976), virus may be the cause of male sterility. With those few exemples, no clear cut evidence is yet available and it seems likely that different mechanisms may be involved between or even within species. It has been suggested that cytoplasmic inheritance can be sometimes the result of the chromosomal state in the female gamete, i.e. of nuclear genes, the activity of which is dependant upon their own product in the cytoplasm (L'Heritier 1975). This implies strict maternal heredity, which is not the case in our results.

To suggest cytoplasmic heterogeneity, which account for all the so far observed results, does not appear contradictory with our present knowledge on cytoplasmic heredity. Interesting analogies can be suggest dealing with other Eucaryotes as hybrid dysgenesis in Drosophila (Picard 1971, 1976; Bucheton 1978; Kidwell and Kidwell 1975), or the incompatibility system in Culex (French 1970, 1978; Subbarao et al. 1977). In higher plants, recent data indeed suggest cytoplasmic molecular heterogeneity for instance, in mt-DNA of maize (Levings et al. 1979) and soybean (Synenki et al. 1978) where amplification of one or several of the supputed "mitochromosomes" (Spruyll et al. 1980) may be further evidenced.

Litterature

Ahokas,H.(1978):Cytoplasmic male sterility in barley.II.Physiology and anther cytology of msm1.Hereditas 89,7-21

Belliard,G.;Vedel,F.;Pelletier,G.(1979):Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of Nicotiana tabacum by protoplast fusion.Nature 281,401-403

Berthelem,P.(1970):Rapport d'activité de la Station d'Amélioration des Plantes de Rennes.I.N.R.A.

Berthelem,P.;Le Guen,J.(1974):Rapport d'activité de la Station d'Amélioration des Plantes de Rennes.I.N.R.A.

Bond,D.A.;Fyfe,J.L.;Toynbee-Clarke,G.(1966):Male sterility in field beans.III.Male sterility with a cytoplasmic type of inheritance.J.agric.Sci.66,359-367

Bucheton,A.(1978):Non-mendelian female sterility in Drosophila melanogaster:influence of ageing and thermic treatments. Heredity 41,357-369

Burton,G.W.(1972):Natural sterility maintainer and fertility restorer mutants in Tift 23 A2 cytoplasmic male sterile pearl millet Pennisetum thyphoides(Burm.)Stapf & Hubb.Crop Sci. 12,635-637

Burton,G.W.(1977):Fertile sterility maintainer mutants of cytoplasmic male sterile pearl millet.Crop Sci.17,635-637

Chen,K.;Meyer,V.G.(1979):Mutation in chloroplast DNA coding for the large subunit of fraction 1 protein correlated with male sterility in cotton.J.Hered.70,431-433

Clement,W.M.(1975):Plasmon mutations in cytoplasmic male sterile pearl millet Pennisetum typhoides.Genetics 79,583-588

Demarly,Y.(1974):Quelques données nouvelles en amélioration des plantes.Agron.tropicale 29,871-891

Edwardson,J.R.(1970):Cytoplasmic male sterility.Bot.Rev.36,341 - 420

Edwardson,J.R.;Bond,D.A.;Christie,R.G.(1976);Cytoplasmic sterility factors in Vicia faba L.Genetics 82,443-449

Forde,B.G.;Oliver,R.J.C.;Leaver,C.J.(1978):Variation in mitochondrial translation products associated with male sterile cytoplasms in maize.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.75,3841-3845

French,W.L.(1970):Evidence for the segregation of cytoplasmic genes in Culex pipiens,an advanced form of animal life. Genetics 64,s22

French,W.L.(1978):Genetic and phenogenetic studies on the dynamic nature of the cytoplasmic inheritance system in Culex pipiens.Genetics 88,447-455

Kidwell,M.G.;Kidwell,J.F.(1975):Cytoplasm-chromosome interactions in Drosophila melanogaster.Nature 253,755-756

Laser,K.D.;Lersten,N.R.(1972):Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms.Bot.Rev.38, 425-454

Laughnan,J.R.;Gabay,S.J.(1973):Mutations leading to nuclear restoration of fertility in S male sterile cytoplasm in Maize.Theoret.Appl.Genetics 43,109-116

Laughnan,J.R.;Gabay,S.J.(1975):An episomial basis for instability of S male sterility in maize and some implications for plant breeding.In:Genetics and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts(ed.Birky,et al.),pp.330-349.Ohio State University.

Laughnan,J.R.;Gabay,S.J.(1978):Nuclear and cytoplasmic mutations to fertility in S male sterile maize.In:Maize breeding and genetics (ed.Walden,D.B.),pp.427-446.John Wilay & Sons Inc.

Leclercq,P.(1971):La stérilité mâle cytoplasmique du Tournesol. I.Premières études sur la restauration de la fertilité.Ann. Amélior.Plantes 21,45-54

Leclercq,P.(1979):La stérilité mâle cytoplasmique du Tournesol. II.Influence de la génétique et du milieu sur la restauration de la fertilité.Ann.Amélior.Plantes 29,201-212

L'Héritier,P.(1975):Génétique.Masson

Levings III,C.S.;Pring,D.R.(1976):Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic male sterile maize.Science 193,158-160

Levings III,C.S.;Pring,D.R.(1978):The mitochondrial genome in higher plants.Stadler Symp.10,77-93

Levings III,C.S.;Shah,D.M.;Hu,W.W.L.;Pring,D.R.;Timothy,D.H. (1979):Molecular heterogeneity among mitochondrial DNAs from different maize cytoplasms.In:Extrachromosomal DNA(ed.Cummings, D.J.;et al.),pp.63-73.Academic Press.

Levings III,C.S.;Kim,B.D.;Pring,D.R.;Conde,M.F.;Mans,R.J.;Gabay-Laughnan,S.J.;Laughnan,R.J.(1980):Cytoplasmic reversion of cms-S in maize:association with a transpositional event. Science 209,1021-1023

Miller,R.J.;Koeppe,D.E.(1971):Southern corn leaf blight:susceptible and resistant mitochondria.Science 173,67-69

Picard,G.(1971):Un cas de stérilité femelle chez Drosophila melanogaster lié à un agent transmis maternellement.C.R.Acad. Sc.Paris 272 série D,2482-2487

Picard,G.(1976):Non mendelian female sterility in Drosophila melanogaster:hereditary transmission of I factor.Genetics 83,107-123

Picard,J.(1972):Rapport d'activité de la Station d'Amélioration des Plantes de Dijon.I.N.R.A.

Pring,D.R.;Levings III,C.S.;Conde,M?F.(1980):The organelle genomes of cytoplasmic male sterile maize and sorghum.In: The Plant Genome(eds.Davies,D.R.;Hopwood,D.A.),pp.111-120. John Innes Charity.

Quetier,F.;Vedel,F.(1977):Heterogeneous populations of mitochondrial DNA molecules in higher plants.Nature 268,265-268

Singh,A.;Laughnan,J.R.(1972):Instability of S male sterile cytoplasm in maize.Genetics 71,607-620

Spruill,W.M.Jr.;Levings III,C.S.;Sederoff,R.R.(1980):Recombinant DNA analysis of the sequence organization of mitochondrial DNA of maize.Develop.genet.(in the press)

Subbarao,S.K.;Krishnamurty;B.S.;Curtis,C.F.;Adak,T.;Chandrahas, R.K.(1977):Segregation of cytoplasmic incompatibility properties in Culex pipiens fatigans.Genetics 87,381-390

Synenki,R.M.;Levings III,C.S.;Shah,D.M.(1978):Physicochemical characterization of mitochondrial DNA from soybean.Plant Physiol.61,460-464

Thiellement,H.(1977a):La stérilité mâle cytoplasmique chez Vicia faba L.I.Historique et hypothèses.Ann.Amélior.Plantes 27,203-209

Thiellement,H.(1977b):La stérilité mâle cytoplasmique chez Vicia faba L.II.Hétérogénéité phénotypique d'une lignée mâle stérile.Ann.Amélior.Plantes 27,547-553

Thiellement,H.(1977c):La stérilité mâle cytoplasmique chez Vicia faba L.III.Hérédité des phénotypes polliniques.Ann. Amélior.Plantes 27,555-562

Thiellement,H.(1979a):Sur quelques descendances de plantes présentant simultanément deux phénotypes polliniques à determinisme non mendélien chez Vicia faba L.C.R.Acad.Sc.Paris 288 série D,827-830

Thiellement,H.(1979b):Cytoplasmic male sterility in Vicia faba L. IV.A grand-mother effect.Ann.Amélior.Plantes 29,163-171

Thiellement,H.(1980):Cytoplasmic male sterility in Vicia faba L. V.Intermediate phenotypes.Ann.Amélior.Plantes 30,123-132

Vear,F.(1980):Male fertility in the descendants of a cross Heliantus tuberosus x H.annuus.Ann.Amélior.Plantes (submitted)

Warmke,H.E.;Lee,S.-H.J.(1977):Mitochondrial degeneration in Texas cytoplasmic male sterile corn anthers.J.Hered.68,213-222

Dr.H.Thiellement
I.N.R.A.
Laboratoire d'Amélioration des Plante
Bat.360.Université de Paris-Sud
91405 Orsay Cedex
France

III - DISCUSSION GENERALE

A - SYNTHESE DE L'EXPERIMENTATION

Une lignée mâle-stérile cytoplasmique de *Vicia faba* présente une hétérogénéité remarquable quant au phénotype pollinique. Nous avons montré que cette hétérogénéité était due à des modifications dans le matériel héréditaire. En effet les plantes S, I et F fournissent en descendance des proportions variables des différents phénotypes. Il en est de même des secteurs S et I des plantes SVI.

Nous avons pu vérifier l'absence d' "effet pollen" en comparant les descendances de plantes mères pollinisées par différentes sources de pollen. Ces résultats, ainsi que ceux relatifs aux modalités somatiques de la réversion phénotypique, confirment le déterminisme exclusivement cytoplasmique des phénotypes floraux dans notre système.

L'évolution phénotypique, intraplante et au cours des générations, se fait vers un état plus fertile. Les exceptions à cette règle (descendants SVI de plantes I, descendants I de secteurs F) confortent l'hypothèse d'une hétérogénéité génétique du cytoplasme puisque dans le phénotype F subsistent, au moins temporairement, les déterminants d'un phénotype moins fertile.

Il est difficile de définir les limites de l'hétérogénéité. L'estimation des proportions relatives des divers phénotypes dans une descendance ne peut se faire qu'en sommant les descendances de plantes mères de même phénotype. La variance intraclasse est grande sous ce critère. On peut rendre compte en partie de ce phénomène

en regroupant les descendances selon le phénotype de la plante grand-mère ou selon les proportions de descendants à la génération précédente. Nous avons qualifié ce facteur d' "effet grand-mère".

Les résultats relatifs aux différents phénotypes intermédiaires montrent que ces derniers sont héritables, à déterminisme cytoplasmique et instables. L'évolution des fréquences phénotypiques dans la généalogie des plantes I est remarquable : la classe I augmente quand la classe SVI disparait et la classe F reste constante, voire régresse. A ce niveau, il n'était plus possible d'interpréter les phénotypes I comme dûs à des mélanges de déterminants S et F. Un troisième déterminant, baptisé S^R apparait nécessaire pour expliquer la relative efficité de la sélection sur I.

Les trois phénotypes I, c'est-à-dire Sn SnI et Ic fournissent les mêmes proportions de plantes F mais différentes proportions de plantes Sn, SnI et Ic. Cette hérédité conduit à envisager au moins un autre déterminant, de même valeur sélective que S^R, baptisé S^{RN} et qui intervient dans la définition des phénotypes Sn et SnI.

Notre hypothèse est la suivante : les "états cytoplasmiques" conduisant aux phénotypes floraux sont déterminés par les quantités relatives variables de constituants cytoplasmiques. Sur ces derniers s'exerce une pression sélective vers une meilleure interaction avec le génotype nucléaire, vers l'état fertile.

Le phénotype I peut être l'expression de différentes compositions cytoplasmiques $[S, F]$, $[S, S^R, F]$

[S^R, F] , [S, S^R, S^{RN}, F], [S^{RN}, S^R, F] voire [S^R, S^{RN}] [S^R] ou [S^{RN}]. On explique ainsi la grande variabilité inter-descendance.

Au cours des générations, on assiste dans les descendances I à l'accroissement des déterminants S^R et S^{RN} au dépens de S : la classe SVI diminue, la classe I augmente et la classe F reste stable voire régresse.

L'"effet grand-mère" serait dû au fait que les plantes I issues de SVI, comme les plantes X issues de S sont surtout déterminées par des mélanges [S, F] où S est fortement contresélectionné, et les plantes I issues de I comme les plantes X issues de I sont surtout [S, S^R, F] où la pression sélective est moindre sur S^R et diminuée sur S du fait des proportions relatives des trois catégories.

En F_{11} les plantes SnI sont [S, S^R, S^{RN}, F] et les plantes I sont [S, S^R, F] ou [S^R, F] ; et en F_{12} le déterminant S a probablement disparu (on ne trouve plus de plantes SVI).

Les résultats expérimentaux ont été interprétés en tenant compte du principe de l'économie des hypothèses. Pourtant on est en droit de se demander si on ne peut pas expliquer n'importe quel phénomène en faisant varier quatre paramètres. L'objectif de ce travail était plutôt de tester la fiabilité de l'hypothèse d'une hétérogénéité génétique du cytoplasme. Ce but est atteint. Il soulève nombre de questions. Quelle est l'origine de l'hétérogénéité cytoplasmique ? Quels sont les mécanismes généraux qui permettent le maintien de l'hétérogénéité ou au contraire amènent à l'homogénéité? Quelle est la nature moléculaire de ces déterminants ?

B - DE "L'HYPOTHESE MITOCHONDRIALE"

1) Tendance à l'homogénéité et origine de l'hétérogénité.

Chez la Levure *Saccharomyces cerevisiae*, on a trouvé de nombreuses mutations portées par l'ADN mitochondrial. Le matériel génétique cytoplasmique peut être échangé lors de la formation du zygote et on obtient ainsi des souches où coexistent différentes molécules d'ADN mitochondrial. L'ADN mitochondrial de Levure est capable de recombinaison. L'homogénéité du cytoplasme est atteinte très rapidement, c'est-à-dire que les caractères étudiés ne segrègent plus. Certains paramètres de cette évolution ont été bien étudiés. Outre la recombinaison, d'autres phénomènes interviennent sur la structure de l'ADN mitochondrial, notamment l'amplification. La plupart des mutations "petites" sont des délétions plus ou moins importantes du chromosone mitochondrial. La région restante est amplifiée et cet ADN répétitif s'organise en molécules circulaires (FAYE *et al*. 1973). N'importe quelle partie de l'ADN mitochondrial peut être concernée. Dans le cas des mutations petites hypersuppressives - celles qui fournissent en croisement avec une souche sauvage une descendance presque exclusivement mutée - la fraction retenue est très courte. Cette fraction contient une séquence, commune aux mutations hypersuppressives, qui pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la réplication. L'hypersuppressivité d'une mutation petite serait alors due à l'affinité accrue (en nombre de sites) de son ADN mitochondrial pour l'ADN polymérase (BLANC & DUJON, 1980).

Chez un autre champignon, *Podospora anserina*, où a été démontrée la recombinaison mitochondriale, on étudie le phénomène de sénescence. L'état sénescent est hérité

maternellement, se transmet par anastomose comme un agent infectieux et dépend de l'apparition puis de l'amplification d'un déterminant cytoplasmique. Pour élucider les bases moléculaires de ce phénomène,les auteurs (BELCOUR & BEGEL, 1978) ont montré que l'ADN mitochondrial était vraisemblablement en cause. Dans les cultures sénescentes, l'ADN mitochondrial se présente sous forme de séries multimériques de molécules circulaires (CUMMINGS *et al*, 1979). Cet ADN répété représente une portion de l'ADN mitochondrial natif (des cultures jeunes) amplifié (JAMET-VIERNY *et al*, 1980). Dans cet exemple les deux types d'information, l'ADN mitochondrial "normal" et l'ADN mitochondrial spécifique de l'état sénescent,coexistent naturellement, le second découlant du premier. Cette hétérogénéité résulte de mutations touchant aléatoirement la molécule d'ADN mitochondrial puisque l'état sénescent apparait au hasard dans chaque souche. Pourtant l'hétérogénéité potentielle naturelle, générée par mutations, est ou non utilisée, retenue, par le noyau. En effet les souches de *Podospora* diffèrent quant à leur durée de vie moyenne.

Après avoir trouvé des mutations de résistance aux antibiotiques, on a pu étudier la génétique mitochondriale chez *Paramecium aurelia*. Par conjugaison ou par injection artificielle de mitochondries on obtient des cytoplasmes mixtes. Les auteurs n'ont jamais pu mettre en évidence la recombinaison mitochondriale (ADOUTTE *et al*., 1979). Dans le cas d'un croisement entre sensible et résistant à un antibiotique, un seul des deux types mitochondriaux parentaux sera retenu : le résistant en présence de la drogue, le sauvage en milieu minimum. Dans ce cas également on aboutit à la purification, à l'homogénéité cytoplasmique. Cette évolution est beaucoup moins

rapide chez la Levure. Dans le même laboratoire (SAINSARD *et al.*, 1975 ; SAINSARD-CHANET & KNOWLES, 1979) on a isolé un suppresseur nucléaire d'une mutation mitochondriale. En présence d'un noyau cl1/cl1, seul le type mitochondial "compatible" sera retenu, le type sauvage"incompatible"sera éliminé. On se trouve là en présence d'une sélection directe par le noyau d'un type d'organite (et de son information ?).

D'après ces quelques exemples tirés des Protistes Eucaryotes, l'hétérogénéité d'un cytoplasme est une réalité qui prend sa source dans les modes nombreux de remaniement de l'ADN mitochondrial (mutations, recombinaisons légitimes ou illégitimes, amplification de segments). Des phénomènes variés vont amener plus ou moins rapidement à l'homogénéité cytoplasmique selon le nombre total des molécules par cellule, les proportions relatives des différents types lors du mélange, l'existence ou non de la recombinaison mitochondriale et les vitesses relatives de replication. La sélection est passive qui dépend de la nature même de la mutation (petites hypersuppressives) et/ou active quand c'est le partenaire de la meilleure interaction avec le noyau (et/ou avec le milieu) qui est retenu.

2) Rôle du noyau sur l'évolution d'un cytoplasme mixte.

On considère généralement que chez ces organismes l'information génétique portée par l'ADN mitochondrial est limitée. Notamment les enzymes de la chaîne respiratoire se composent de sous-unités codées pour partie par l'ADN nucléaire et pour partie par l'ADN mitochondrial. Le rôle physiologique majeur de la respiration impose une adaptation optimum des produits de ces deux sources d'information. On peut imaginer que le noyau exerce une pression sélective sur une variabilité génétique cyto-

plasmique. De plus l'expression comme la réplication de l'ADN mitochondrial est sous le contrôle de l'ADN nucléaire.

Un autre exemple du rôle du noyau sur l'information portée par les mitochondries est fourni par les cellules animales. On peut cultiver des cellules hybrides Homme - Souris résultant de fusion cellulaire. En utilisant des marqueurs de résistance aux antibiotiques, HORAK *et al.* (1974) ont mis en évidence la recombinaison entre les molécules d'ADN mitochondrial. Avec le même matériel, DE FRANCESCO *et al.* (1980) ont montré qu'un seul des deux types parentaux persiste dans les cellules hybrides, celui correspondant à l'espèce dont les chromosomes ne ségrègent pas. Ces deux groupes de résultats peuvent s'expliquer de la même façon : l'ADN mitochondrial retenu est celui présentant la meilleure interaction avec le génotype nucléaire.

Le génotype nucléaire joue donc un rôle essentiel sur l'évolution d'un cytoplasme mixte. Les mêmes phénomènes n'ont pas lieu dans le même sens ou à la même vitesse selon le contexte nucléaire. C'est également le cas des stérilités mâles cytoplasmiques instables. Aussi bien pour le cytoplasme S du Maïs que pour les deux cytoplasmes du Mil ou de la Féverole, le taux d'instabilité (la fréquence de plantes mâle-fertiles) varie selon le génotype du parent mâle récurrent (mainteneur). Il apparait bien dans nos résultats que l'évolution intraplante ou intergénérations se fait vers l'état fertile et ce de façon irréversible. Tout laisse à penser que l'on aboutit à l'homogénéité du cytoplasme, l'état mâle-fertile (homoplasmon *F*). En revanche on ne peut aboutir à un homo-

plasmon *S*. On peut en déduire, par analogie avec les résultats obtenus ches la Paramécie, que l'interaction entre le noyau mainteneur et le déterminant *S* est beaucoup moins bonne que les interactions possibles avec les déterminants S^R, S^{RN} et *F*. Dès que ces derniers apparaissent, ils vont progressivement prendre le dessus sur les déterminants *S*.

3) Recombinaison et hétérogénéité moléculaire chez les Végétaux Supérieurs.

Chez le Tabac, BELLIARD *et al.* (1977) ont utilisé la possibilité de régénérer des plantes après fusion somatique de protoplastes. Le choix de marqueurs nucléaires et cytoplasmiques leur ont permis de retenir des plantes régénérées ne différant des lignées parentales que par des caractères à déterminisme cytoplasmique : la morphologie florale et la stérilité mâle. L'analyse des ADN mitochondriaux et chloroplastiques par les enzymes de restriction a permis de montrer que très rapidement après la fusion, un nouvel état cytoplasmique, qui peut être intermédiaire entre les deux types parentaux, s'instaure et se stabilise. Les mêmes phénotypes floraux et moléculaires (BELLIARD *et al.*, 1978, 1979) demeurent stables et hérités maternellement même après plusieurs générations de reproduction sexuée ou de multiplication végétative. Dans ce cas, l'hétérogénéité génétique construite lors de la fusion somatique semble très rapidement disparaître pour faire place à de nouveaux cytoplasmes, différents des deux parentaux, mais homogènes et stables. Les auteurs concluent qu'il y a eu recombinaison génétique de l'ADN mitocondrial .

La situation rencontrée chez le Tabac s'apparente à celle de la Levure.Après le mélange, la recombinaison a lieu et très rapidement un état stable, *a priori* homogène, s'instaure. Contrairement aux expériences sur les fusions de cellules Homme-Souris, différents états cytoplasmiques peuvent se stabiliser en interaction avec le même génotype nucléaire. Cette situation n'est pas celle de la Fève où les phénotypes intermédiaires ne sont pas stables.

L'ADN mitochondrial des Végétaux Supérieurs apparait nettement différent de l'ADN mitochondrial de Protistes ou de Mammifères. Beaucoup plus long, il ne se présente pas toujours sous la forme d'une molécule circulaire unique. QUETIER et VEDEL (1977) ont montré l'existence d'une hétérogénéité moléculaire de l'ADN mitochondrial de divers espèces. En effet, après digestion par une endonucléase,la somme des poids moléculaires des différents fragments excède sensiblement le poids moléculaire calculé en mesurant les molécules circulaires en microscopie électronique. Ce résultat est retrouvé chez le Tabac (BELLIARD, 1979) et chez le Maïs (LEVINGS *et al.*, 1979). De plus,les cytoplasmes T, N et S du Maïs peuvent être distingués par les fréquences des différentes tailles des molécules circulaires d'ADN mitochondrial. Les classes majoritaires sont très différentes dans les trois cytoplasmes analysés (LEVINGS*et al.*, 1979). Ces différentes molécules portent-elles des informations différentes ? Pour répondre à cette question SPRUYLL *et al.* (1980) ont digéré par une endonucléase l'ADN mitochondrial normal du Maïs, isolé, cloné et marqué 28 des fragments obtenus. Pour 25 de ces fragements, chacun ne peut s'hybrider après transfert sur nitrocellulose qu'avec lui-même. Cela signifie que chacun de ces frag-

ments porte une séquence unique. La somme de ces fragments représentant beaucoup plus que la taille maximale des molécules observées, les auteurs concluent à l'existence de plusieurs molécules génétiquement distinctes, de plusieurs "mitochromosomes".

Chez le Soja, légumineuse comme la Fève, l'ADN mitochondrial analysé par des méthodes physicochimiques apparait complexe (SYNENKI *et al.*, 1978). Il serait composé d'un grand nombre de molécules circulaires de taille comprise entre 5 et 30 µm. On rencontre également des minicercles.

4) Stabilité et hétérogénéité

Il existe donc chez la plupart des Végétaux étudiés jusqu'à ce jour une hétérogénéité moléculaire de l'ADN mitochondrial. Cette hétérogénéité pourrait également être source de variabilité génétique si des phénomènes de recombinaison légitime ou illégitime (minicercles) ont lieu entre ces molécules. Pourtant la plupart des cytoplasmes étudiés apparaissent invariants.

C'est le cas du cytoplasme T du Maïs qui fut très utilisé en raison notamment de sa parfaite stabilité. Une maladie s'est développée, spécifique de ce cytoplasme, due à *Helminthesporium maydis* race T. Les auteurs ont cherché un moyen d'obtenir des plantes mâle - stériles résistantes. GENGENBACH *et al.*, après culture *in vitro* de scutellum de Maïs mâle-stériles Texas en présence de la toxine du champignon, ont régénéré des plantes résistantes à la toxine et mâle-fertiles. BRETTEL *et al.* (1980) travaillant selon la même méthodologie, ont retrouvé ce résultat. De plus, ils ont également régénéré des plantes mâle-fertiles résistantes à partir du lot témoin sans

toxine, ainsi qu'une plante mâle-fertile sensible dans ce même milieu sans agent sélectif. Toutes ces mutations sont à hérédité maternelle. L'analyse par les enzymes de restriction a été effectuée sur 5 plantes régénérées sur milieu sélectif (GENGENBACH *et al.* sous presse) : 4 plantes résistantes mâle-fertiles et 1 plante sensible mâle-stérile. Toutes ces plantes ont des ADN mitochondriaux différents entre eux et différents à la fois de T et de N, mais proches du diagramme de Texas. Les auteurs proposent trois hypothèses explicatives : des événements de recombinaison, l'intégration d'épisomes ou l'amplification différentielle d'éventuels mitochromosomes de N.

Il semble donc que même dans une situation cytoplasmique très stable comme celle du cytoplasme T, il existe une hétérogénéité génétique potentielle. La culture *in vitro*, en présence et même en absence d'agent sélectif, permet de la révéler. On connaît aujourd'hui de nombreux exemples de "variants" obtenus *in vitro* qui présentent des caractères différents de la lignée "pure" dont ils sont issus. Ce sont les plantes haploïde-doublées obtenues après culture d'anthères ou d'ovaires non fécondés chez le Riz (KOUADIO, 1979), l'Orge (SAN NOEM, sous presse) ou les plantes régénérées à partir de petits fragments de Laitue (SIBI, 1976). Dans ces exemples, les auteurs proposent un déterminisme cytoplasmique des caractères variants.

On peut admettre d'après ces quelques expériences qu'un cytoplasme même stable est hétérogène au niveau moléculaire et qu'il est génétiquement variable. On a montré d'ailleurs qu'il existait une certaine variabilité au niveau des ADN mitochondriaux entre différentes

lignées de Maïs possédant le cytoplasme N (LEVINGS & PRING, 1971) ou le cytoplasme C (PRING *et al.*, 1980).

Lorsque l'on analyse les ADN cytoplasmiques par les enzymes de restriction, on admet généralement que l'on ne peut révéler des séquences, des fragments, qui ne seraient présents qu'en faible quantité relative, de l'ordre de 5 %. On peut donc remarquer que la prise en compte de phénomènes d'amplification de séquences, fragments ou mitochromosomes, et son contraire de réduction en quantité, permet d'interpréter de nombreux résultats obtenus aussi bien chez le Maïs que le Tabac.

5) Origine moléculaire de l'instabilité

Le cas du cytoplasme 447 de *Vicia faba* est plus proche, par son instabilité, de celui du cytoplasme S du Maïs. Avec une méthodologie génétique LAUGHNAN & GABAY (1975) ont montré que l'on obtenait, à partir d'une lignée mâle-stérile deux types de révertants mâle fertiles :les uns à hérédité cytosplamique, les autres à hérédité nucléaire. Les nouveaux gènes nucléaires de restauration se localisent sur différents chromosomes. Ils proposent l'hypothèse suivante : dans le cytoplasme S, un épisome "de fertilité" libre dans le cytoplasme ne peut s'exprimer ; il s'exprimera une fois intégré soit à l'ADN mitochondrial (révertant mâle-fertile cytoplasmique)soit à l'ADN nucléaire.

Sur ce cytoplasme, l'analyse moléculaire a révélé, associées à l'ADN mitochondrial, deux molécules linéaires aux extrémités en séquences inversées appelées plasmides S1 et S2 (PRING *et al.*, 1977). Les revertants mâle-fertiles, à hérédité cytoplasmique, ne possèdent

plus ces plasmides. Par hybridation moléculaire, LEVINGS *et al.* (1980) ont montré qu'une partie au moins de l'information génétique portée par ces plasmides se retrouvait dans l'ADN mitochondrial de ces revertants. Ceci conforte l'hypothèse de LAUGHNAN & GABAY.

La fréquence d'instabilité et la nature de la mutation, nucléaire ou cytoplasmique, sont sous le contrôle du génôme nucléaire (LAUGHNAN & GABAY-LAUGHNAN, 1979). Ainsi la lignée M825, particulièrement instable, est caractérisée par une moindre importance relative de S2 par rapport à S1 (LEVINGS *et al.*, 1980). Quand on utilise M825 comme parent mâle récurrent en croisement avec une lignée S où S1 et S2 sont en égale quantité on retrouve S2 en moindre quantité après trois rétro-croisements (CARLSON, communication personnelle). Ainsi un génôme nucléaire contrôle les quantités relatives d'une information cytoplasmique.

On connait depuis longtemps le contrôle exercé par le noyau sur la quantité d'ADN mitochondrial chez la Levure. Cela est-il également vrai pour l'ADN mitochondrial "principal" des Végétaux ? Récemment WILBUTT (sous presse) montre que différents fragments de restriction peuvent être en quantités relatives variables au sein d'un même cytoplasme selon le génotype nucléaire. On peut

imaginer que les proportions relatives des différents "mitochromosomes" sont contrôlées par le génome nucléaire.

C'est au niveau du contrôle nucléaire des quantités d'un déterminant cytoplasmique (et pas seulement de son expression) que l'on peut rappeler l'hypothèse formulée dans ce mémoire. La restauration permanente serait due à la sélection très rapide des déterminants *F* en présence du gêne de restauration. Les génotypes mainteneurs sont à cet égard plus ou moins efficaces.

6) Conclusions pour *Vicia faba*

L'analogie avec le cytoplasme S du Maïs ne peut pas être étendue au modèle explicatif. Il n'existe pas de phénotypes intermédiaires alors que l'essentiel de nos expérimentations porte sur le déterminisme des phénotypes I. On pourrait pourtant imaginer l'intervention d'un épisome dans notre système. Soit une molécule d'acide nucléique cytoplasmique où se trouve intégré un épisome : c'est le déterminant *S*. Aléatoirement et/ou avec une fréquence variable selon le génotype nucléaire, cet épisome est libéré. Si l'excision se fait bien on aboutit au déterminant *F*, si l'excision est imparfaite, on obtient les déterminants S^R ou S^{RN}. Sous cette hypothèse, on doit pouvoir obtenir des homoplasmons S^R ou S^{RN}, l'épisome (de stérilité) ayant été perdu, ces déterminants ne peuvent plus aboutir à la molécule *F*. L'efficacité relative de la sélection sur les phénotypes I va dans ce sens mais il faudrait poursuivre l'étude généalogique sur plusieurs générations encore.

Dans le but d'essayer d'établir les bases moléculaires des différents phénotypes observés, VEDEL (non

publié) a analysé les ADN chloroplastiques et mitochondriaux extraits de feuilles de plantes S, Ic et F. Après digestion avec EcoRI, aucune différence n'a été trouvée entre les électrophorégrammes obtenus. L'électrophorèse sans digestion enzymatique n'a pas révélé un éventuel plasmide. Ces résultats négatifs n'infirment ni ne confirment l'hypothèse d'hétérogénéité. Les ADN cytoplasmiques pourraient apparaître différents avec d'autres enzymes de restriction et la nature préliminaire de ces expériences ne permettait pas de quantifier les différents fragments.

Quelle est la nature des déterminants cytoplasmiques en cause dans notre système ? Les quelques pages précédentes visent à rendre compte de quelques données expérimentales sur l'ADN mitochondrial. Les expériences relatives au Tabac et au cytoplasme S du Maïs sont celles qui établissent avec le moins d'incertitudes que l'ADN mitochondrial est impliqué dans le déterminisme de la stérilité mâle. Par analogie, les déterminants S, S^{R}, S^{RN} et F pourraient représenter différentes "formes allèliques" de l'ADN mitochondrial. Sous cette hypothèse nous avons montré par les exemples qui précèdent que l'hétérogénéité génétique existe dans l'ADN mitochondrial des Végétaux, au moins potentiellement, que cet ADN a une structure moléculaire complexe et mal connue (différents "mitochromosomes" en différentes quantités ?), que divers modes de remaniement interviennent à ce niveau (recombinaison, transposition) et que le génôme nucléaire joue un rôle capital non seulement sur l'expression mais aussi sur la réplication de cet ADN mitochondrial.

7) Problème de l'hétérogénéité latente.

Dans le cadre de cette"hypothèse mitochondriale", une importante question reste posée. L'hétérogénéité existe-t-elle de façon latente dans tout cytoplasme de Plante Supérieure , comme le suggère DEMARLY (1974, 1977), ou bien les mutations qui apparaissent ne sont retenues (et amplifiées) que dans certains cas particuliers d'inadaptation entre informations nucléaires et cytoplasmiques ?

Nous avons discuté de l'origine de l'hétérogénéité comme résultant directement de la structure de l'ADN mitochondrial (mutations - remaniements). Une autre possibilité pourrait être le passage par le pollen de déterminants cytoplasmiques(de mitochondries normales). Ce n'est pas le cas du cytoplasme S du Maïs où des événements de transposition paraissent à l'origine de l'instabilité. On peut imaginer que chez la Féverole des déterminants *F* sont apportés à chaque croisement. On sait que chez un certain nombre de Gymnospermes (CAMEFORT 1969, 1978) le pollen apporte des mitochondries qui vont constituer le "néocytoplasme" avec celles de l'ovule. Chez quelques Angiospermes comme *Pelargonium, Phaseolus, Hyperion, Borrago, Nepata, Streptocarpus* (cités par GRÜN, 1976) on a montré la transmission paternelle des plastes.

Les déterminants S^R et S^{RN} pourraient alors résulter de la mise en présence des déterminants *S* et *F*. Nous avions remarqué précédemment (publication de l'introduction) qu'il semblait contradictoire qu'une même lignée fut restauratrice pour un cytoplasme (capacité particulière de transmettre et sélectionner des déterminants *F*) et mainteneuse pour l'autre cytoplasme. D'autre part nous n'avons pas mis en évidence un "effet pollen" mais si

l'apport de déterminants *F* est de faible importance nous n'étions pas en mesure de le déceler sur une génération. Considérer cette éventualité c'est encore une fois rendre exceptionnel le cas de *Vica faba*, toute stérilité mâle cytoplasmique devant à terme apparaître instable. Pourtant si on tient compte de l'apport cytoplasmique du gamète mâle, le problème de l'hétérogénéité latente ou non se pose différemment car l'hétérogénéité est constamment entretenue à chaque croisement de maintien.

Mais, même pour le cytoplasme S du Maïs on pourrait considérer l'existence d'un transposon comme une hétérogénéité latente. On a d'ailleurs démontré qu'une partie au moins de la séquence des plasmides S_1 et S_2 fait partie intégrante de l'ADN mitochondrial du cytoplasme N (SPRUYLL *et al.*, 1980). On trouve ce type de molécules (plasmides ?) dans tous les cytoplasmes de Maïs (KEMBLE & BEDBROOK, 1980).

C - DE "L'HYPOTHESE VIRALE"

Il nous semble utile de discuter maintenant le système étudié dans le cadre de l' "hypothèse virale".

Les virus, ou d'autres endosymbiotes cellulaires, sont responsables d'un certain nombre de phénomènes à hérédité cytoplasmique qui ont une importance au niveau de la spéciation, de l'évolution. C'est le cas, par exemple, des phénomènes d'incompatibilité de croisement chez *Culex pipiens fatigans* où plus de 17 types d'incompatibilité cytoplasmique ont été identifiés. Ils se manifestent par une stérilité femelle et sont dus à la présence d'endosymbiontes proches des rickettsies, *Wolbachia pipientis*. Les auteurs (FRENCH, 1970, 1978 ; SUBBARAO *et al.*, 1977) ont montré qu'il pouvait exister

chez une même femelle une hétérogénéité génétique de ces facteurs cytoplasmiques et par suite une ségrégation des différents types. L'incompatibilité cytoplasmique a été trouvée chez d'autres insectes comme *Ephestia cautella* (BROWER, 1978). Elle serait due à des endosymbiontes chez *Drosophila paulistorum* (EHRMANN, 1967). Chez les Plantes Supérieures on a recensé de très nombreux virus, viroïdes, endosymbiontes qui n'ont d'ailleurs pas toujours un caractère infectieux. D'autre part, certains virus induisent une stérilité mâle (SIEGMUND, 1976).

Chez l'Ail, *Allium sativum*, on ne connait pas de reproduction sexuée, toutes les plantes sont en fait mâle-stériles. KONVICKA *et al*.,(1978) y ont observé en microscopie électronique des organismes proches des rickettsies (Rickettsie Like Organisms). En traitant les plantes avec un antibiotique, la tétracycline, ils ont pu obtenir des plantes produisant du pollen, et les "R.L.O." avaient disparu. La stérilité mâle semble donc conditionnée dans ce cas par ces "R.L.O.".

On peut imaginer que chez la Fève également des organismes de ce type induisent la stérilité mâle. L'instabilité serait alors la conséquence de guérisons spontanées. Pour tester cette hypothèse nous avons expérimenté à petite échelle l'éffet de la tétracycline sur un lot de plantes Ad23 mâle stériles cytoplasmiques. Les différents phénotypes observés étaient dans les mêmes proportions dans le lot traité et dans le lot témoin, mais les effectifs étaient petits (une trentaine de plantes par lot).

Nous avons discuté dans les chapitres précédents en quoi nos observations étaient peu compatibles avec l'hypothèse d'un virus mais la variété des endosymbiontes possibles est si grande et les lois de leurs propagations si mal connues que l'on ne saurait exclure cette hypothèse.

C'est dans ce cadre qu'il faut situer une autre approche moléculaire qui a été réalisée sur des lignées de *Vicia faba* mâle-stériles cytoplasmiques et mâle-fertiles isogéniques. Dans la fraction cytosolique, GRUILL & PRING (communication personnelle) ont trouvé en abondance, dans le lot mâle-stérile, plusieurs espèces moléculaires d'ARN en double brin de haut poids moléculaire. Ces observations peuvent être rapprochées de celles d'EDWARDSON et al. (1976) qui ont observé en microscopie électronique des "cytoplasmic spherical bodies" chez les mâle-stériles. Là encore ces résultats ne constituent pas une preuve, puisqu'il faudrait isoler ces ARN ou ces C.S.B., les injecter à une plante mâle-fertile pour l'infecter, constater la modification phénotypique et la multiplication de ces entités, entités capables de nouveau de se comporter en agents infectieux.

Bien qu'ils ne suffisent pas à établir un lien causal, ces arguments expérimentaux doivent être pris en considération. On pourrait construire un modèle explicatif où les déterminants seraient des particules virales. Le virus S mute vers des formes S^R ou S^{RN}. Il peut être perdu générant ainsi un phénotype mâle-fertile. Ce modèle réduit le nombre de déterminants nécessaires à 3 et constitue a priori une simplification. Pourtant un certain nombre d'hypothèses supplémentaires sont nécessaires. L'état "guéri" peut-être atteint sans que le virus ait disparu

(plantes I provenant de secteurs F). Une même plante peut apparaître guérie puis virosée (plantes FVI, F/I) sans pour autant que le virus s'établisse définitivement (instabilité : descendances F de I). Pour interpréter "l'effet grand'mère", il faudrait admettre que le phénotype I puisse être défini également par un faible niveau de déterminants *S*, ce qui est contradictoire avec l'évolution des fréquences. Ce virus ne se transmet pas par greffe. La réplication du virus est contrôlée par le génôme de la plante hôte (le gène Rf est un gène de résistance insurmontable). Le virus affecte exclusivement la gamétogenèse mâle. Les deux cytoplasmes mâle-stériles de la Fève ont des déterminismes différents (présence de C.S.B. dans un seul des deux cas).

Il faut signaler l'effet de la température ou des chocs thermiques et lumineux sur le phénotype (DUC, 1978 ; LEGUEN *et al.*, communication personnelle). On peut par ces facteurs externes induire la production de pollen chez une plante mâle-stérile. Les phénotypes induits ne semblent pas, aujourd'hui encore, héritables. Seules certaines plantes d'une lignée mâle-stérile réagissent au traitement. L'effet est variable selon les individus. La modification phénotypique induite est réversible, ce n'est pas le cas de celles observées dans nos conditions. Ces quelques caractéristiques ne nous semblent pas correspondre *a priori* aux réactions attendues dans le cas d'un virus sensible à la température. Elles pourraient aussi bien s'interpréter comme des influences externes sur la physiologie générale de la plante et de sa gamètogenèse mâle, sans incidence directe sur l'évolution des déterminants.

°°°

Sur le plan des analogies que l'on peut faire avec le système étudié dans ce mémoire, il existe un phénomène à hérédité complexe dont l'analyse génétique a pu être poussée assez loin : la stérilité femelle non-mendelienne chez *Drosophila melanogaster* (PICARD 1971, 1977 ; BUCHETON, 1978 ; revue par BREGLIANO *et al.*, 1980). La stérilité femelle, qui s'exprime à la deuxième génération après le croisement est conditionnée par un facteur chromosomique apporté par le mâle (le facteur I, pour Inducteur) et par un facteur cytoplasmique présent chez la femelle (le facteur R, pour Réacteur). On peut trouver de nombreuses analogies entre ce système et la stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba* : effet de la température, du vieillissement (phénomènes SVI, IVF), "effet grand-mère", expression quantitative du phénotype. L'état de réactivité, qui dépend du facteur R, est contrôlé à long terme (de l'ordre de la dizaine de générations) par le génôme nucléaire. Ceci peut être rapproché de la variation de la fréquence d'instabilité de la stérilité mâle de *Vicia faba* en fonction du génotype mainteneur. Le ou les déterminants impliqués sont encore inconnus mais l'analyse génétique du facteur I a montré un phénomène original, la "contamination chromosomique", qui est interprété par une transposition systématique chez les femelles, dites "SF" dans ce système, du facteur I à tous les chromosomes.

D - CONCLUSIONS

1) Sur la nature des déterminants

Au terme de ce travail, il n'est pas possible de définir la nature moléculaire des déterminants impliqués dans la stérilité mâle cytoplasmique chez *Vicia faba*.

Les propriétés que doivent posséder ces déterminants ont été déduites de l'analyse génétique. Elles peuvent aussi bien être celles de molécules remaniées de l'ADN mitochondrial (mutations, transpositions, amplifications) que celles de molécules d'origine exogène.

Mais *la distance est-elle si grande entre un virus ou viroïde symbiotique ou latent, un épisome, plasmide ou transposon et une molécule constitutive de l'ADN mitochondrial ?*

2) Sur quelques perspectives pour l'amélioration des plantes.

Différents programmes visant à aboutir à un cytoplasme mâle-stérile utilisable en sélection ont été suggérés et sont en cours de réalisation. La sélection maternelle généalogique (cytoplasmique) sur le phénotype S est un échec dans nos conditions mais on peut l'envisager dans d'autres conditions nucléaires ou en sélectionnant sur les phénotypes intermédiaires, sur Sn notamment. La recherche d'exceptions à la permanence de la restauration pourrait révéler un état cytoplasmique différent, et peut-être stable. Cette particularité de la restauration est également envisagée comme crible d'une mutagenèse effectuée sur une lignée mâle-stérile.

Une approche génétique classique peut encore fournir nombre de réponses aux questions que l'on se pose sur le déterminisme précis des caractères mainteneurs et restaurateurs (nombre de gènes, diversité allélique de rf, de Rf ?) sur le cytoplasme 350 (restauration gamétophytique, sporophytique, permanente ?) et sur l'effet des facteurs externes. Les phénotypes induits

sont-ils héritables ? Existe-t-il des combinaisons noyau-cytoplasme insensibles à ces facteurs ?

Enfin on peut se demander si le type d'interprétation retenu pour *Vicia faba* ne pourrait pas rendre compte d'un certain nombre de phénomènes rencontrés par le sélectionneur. Citons par exemple les stérilités mâles cytoplasmiques du Mil, du Maïs (cytoplasme C), de la Betterave ou du Colza ; les "effets cytoplasmiques" résultant de croisements interspécifiques chez le Coton, le Blé ; et peut-être aussi l'hérédité maternelle constatée dans certains aspects de l'hétérosis, les "variants" issu de culture *in vitro*.

3) Sur la méthodologie

Nous avons choisi d'aborder le problème de la stérilité mâle cytoplasmique de la Fève par une méthodologie génétique que l'on pourrait qualifier d'orthodoxe. Ce type d'approche a permis par exemple une compréhension poussée du cytoplasme S du Maïs ou de la stérilité femelle de la Drosophile. Elle ne permet pas de définir la nature moléculaire précise du support de l'hérédité. Par contre, elle établit, par l'étude des ségrégations, le lien causal entre une information et un phénotype. L'analyse moléculaire est sans aucun doute indispensable mais elle doit utiliser et s'appuyer sur les données de l'analyse génétique.

°°°

BIBLIOGRAPHIE DE LA DISCUSSION

ADOUTTE A., KNOWLES J.K. & SAINSARD-CHANET A. 1979. Absence of detectable mitochondrial recomination in *Paramecium*. Genetics 93 : 797-831.

BELCOUR L. & BEGEL O. 1978. Lethal mitochondrial genotypes in *Podospora anserina* : a model for senescence. Molec. gen. Genet. 163 : 111-123.

BELLIARD G., PELLETIER G. & FERAULT M. 1977. Fusion de protoplastes de *Nicotiana tabacum* à cytoplasmes différents : étude des hybrides cytoplasmiques néo-formés. C.R.Acad.Sc. Paris 284 série D : 749-752.

BELLIARD G., PELLETIER G., VEDEL F. & QUETIER F. 1978. Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic parasexual hybrids of *Nicotiana tabacum*. Molec. gen. Genet. 165 : 231-237.

BELLIARD G., VEDEL F. & PELLETIER G. 1979. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotania tabacum* by protopast fusion. Nature 281 : 401-403.

BLANC H. & DUJON B. 1980. Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77 : 3942-3946.

BREGLIANO J.-C., PICARD G., BUCHETON A., PELISSON A., LAVIGE J.-M. & L'HERITIER P. 1980. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. Science 207 : 606-611.

BRETTELL R.I.S., THOMAS E. & INGRAM D.S. 1980. Reversion of Texas male sterile cytoplasm maize in culture to give fertile, T-toxin resistant plants. Theoret. Appl. Genet. 58 : 55-58.

BROWER J.H. 1978. Propensity of interstrain mating in cytoplasmically incompatible strains of the almond moth. J. Econ. Entomol. 71 : 585-586.

BUCHETON A. Non-mendelian female sterility in *Drosophila melanogaster* : influence of ageing and thermic treatments.1. evidence for a partly inheritable effect of these two factors. Heredity 41 : 357-359.

CAMEFORT H. 1969. Fécondation et proembryogenèse chez les Abiétacées (notion de néocytoplasme). Rev. Cytol. Biol. vég. 32 : 253-271.

CAMEFORT H. 1978. Evolution des structures cytoplasmiques au cours de la gamètogenèse mâle chez le *Picea asperata* Soc. bot. Fr., Actualités Botaniques 1-2 : 109-113.

CUMMINGS D.J., BELCOUR L. & GRANDCHAMP C. 1979. Mitochondrial DNA from *Podospora anserina*.II. Properties of mutant DNA and multimeric circular DNA from senescent cultures.Molec. gen. Genet. 171 : 239-250.

DE FRANCESCO L., ATTARDI G. & CROCE C.C. 1980. Uniparental propagation of mitochondrial DNA in mouse-human cell hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 4079-4083.

DEMARLY Y. 1974. Quelques données nouvelles en amélioration des plantes. L'Agronomie Tropicale 29 : 871-891.

DEMARLY Y. 1977. Génétique et amélioration des plantes. Masson.

DUC G. 1978. Modalités d'expression et hypothèses explicatives du manque de stabilité de la stérilité mâle cytoplasmique de la fèverole (*Vicia faba* L.) Thèse de Dr. Ir. U. Paris-Sud. 46 p.

EDWARDSON J.R., BOND D.A. & CHRISTIE R.G. 1976. Cytoplasmic sterility factors in *Vicia faba* L. Genetics 82 :443-449.

EHRMAN L. 1967. A study of infectious hybrid sterility in *Drosophila paulistorum*.Molec. gen. Genet. 103:218-22.

FAYE G., FUKUHARA H., GRANDCHAMP C., LAZOWSKA J., MICHEL F., CASEY J., GETZ G.S., LOKER J., RABINOWITZ M., BOLOTIN-FUKUHARA M., COEN D., DEUTSCH J., DUJON B., NETTER P. & SLONIMSKI P.P. 1973. Mitochondrial nucleic acids in the *petite colonie* mutants : deletions and repetitions of genes. Biochimie 55 : 779-792.

FRENCH W.L. 1970. Evidence for the segregation of cytoplasmic genes in *Culex pipiens*, an advanced form of animal life. Genetics 64: s22.

FRENCH W.L. 1978. Genetic and phenogenetic studies on the dynamic nature of the cytoplasmic inheritance system in *Culex pipiens*. Genetics 88 : 447-455.

GENGENBACH B.G., GREEN C.E. & DONOVAN C.M. 1977. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. Proc. Natl.Acad.Sci. USA 74 : 5113-5117.

GENGENBACH B.G., CONNELLY J.A., PRING. D.R. & CONDE M.F. 198?. Mitochondrial DNA variation in maize plants regenerated during tissue culture selection. Theor. Appl. Genet. (sous presse).

GRUN P. 1976. Cytoplasmic genetics and evolution. Columbia University Press. New York.

HORAK I., COON H.G. & DAWID I.B. 1974. Interspecific recombination of mitochondrial DNA molecules in hybrid somatic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 : 1828-1832.

JAMET-VIERNY C., BEGEL O. & BELCOUR L. 1980. Senescence in *Podospora anserina* : amplification of a mitochondrial DNA sequence. Cell 21 : 189-194.

KEMBLE B.J. & BEDBROOK J.R. 1980. Low molecular weight circular and linear DNA in mitochondria from normal and male-sterile *Zea mays* cytoplasm. Nature 284 : 565-566.

KONVICKA O., NIENHAUS F. & FISCHBECK G. 1978. Investigations on the causes of pollen sterility in *Allium sativum* L.Z. Pflanzenzüchtg. 80. 265-276.

KOUADIO S.Y. 1979. Analyse génétique de la variabilité observée dans une lignée pure de riz (*Oriza sativa* variété Cigalon) traitée par androgenèse *in vitro*. Thèse de Dr. Ir. U. Paris-Sud. 161 p.

LAUGHNAN J.R. & GABAY S.J. 1975. An episomial basis for instability of S-male sterility in maize and some implications for plant breeding. in "Genetics and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts" ed. BIRKY et al. Ohio State University. 333-349.

LAUGHNAN J.R. & GABAY-LAUGHNAN S.J. 1979. Nuclear control over reversions to male fertility in cms-S maize strains. Maize Genet. Coop. Newslett. 53 : 90-92.

LEVINGS III C.S. & PRING D.R. 1977. Diversity of mitochondroam genomes among normal cytoplasms of maize. J. Hered. 68 : 350-354.

LEVINGS III C.S., SHAH D.M., HU W.W.L., PRING D.R. & TIMOTHY D.H. 1979. Molecular heterogeneity among mitochondrial DNAs from different maize cytoplasms. in "Extrachromosomal DNA" ed. CUMMINGS et al. Academic Press. 63-73.

LEVINGS III C.S., KIM B.D., PRING D.R., CONDE M.F., MANS R.J. LAUGHNAN J.R. & GABAY-LAUGHNAN S.J. 1980. Cytoplasmic reversion of cms-S in maize : association with a transpositional event. Science 209 : 1021-1023.

PICARD G. 1971. Un cas de stérilité femelle chez *Drosophila melanogaster* lié à un agent transmis maternellement. C.R. Acad. Sc.Paris 272 série D : 2482-2487.

PICARD G. 1977. Le phénomène SF chez *Drosophila melanosaster* Mise en évidence des facteurs R et I et des principales propriétés de I. Thèse d'Etat. U. Clermont-Ferrand II. n° 234.

PRING D.R., LEVINGS III C.S., HU W.W.L. & Timothy D.H. 1977. Unique DNA associated with mitochondria in the S type cytoplasm of male sterile maize. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 74 : 2904-2908

PRING D.R., CONDE M.F. & LEVINGS III C.S. 1980. DNA heterogeneity within the C group of maize male sterile cytoplasms. Crop Sci. 20 : 159-162.

QUETIER F. & VEDEL F. 1977. Heterogeneous population of mitochondrial DNA molecules in higher plants. Nature 268 365-368.

SAINSARD A., CLAISSE M. & BALMEFREZOL M. 1974. A nuclear mutation affecting structure and function of mitochondria in *Paramecium*. Molec. gen. Genet. 130 : 113-125.

SAINSARD-CHANET A. & KNOWLES J. 1979. Restoration of nucleo-mitochondrial compatibility in *Paramecium*. Genetics 93 : 833-859.

SIBI M. 1976. La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs. II. Aspect expérimental. Obtention de variants par culture de tissus *in vitro* sur *Lactuca sativa* L.. Apparition de vigueur chez les croisements. Ann. Amélior. Plantes 26 : 523-547.

SIEGMUND F. 1976. Männliche sterilität und virus. Arch. Züchtungforsh. Berlin 6 : 39-45.

SPRUYLL Jr. W.M., LEVINGS III C.S. & SEDEROFF R.R. 1980. Recombinant DNA analysis indicate that the multiple chromosomes of maize mitochondria contain different sequences. Dev. Genetics 1 : 363-378.

SUBBARAO S.K., KRISHNAMURTY B.S., CURTIS C.F., ADAK T. & CHANDRAHAS R.K. 1977. Segretation of cytoplasmic incompatibility properties in *Culex pipiens fatigans*. Genetics 87 : 381-390.

RESUME

La stérilité mâle cytoplasmique est un phénomène largement répandu chez les Angiospermes. Il présente un double intérêt, économique et fondamental : c'est un outil génétique utile au sélectionneur pour contrôler les croisements et exploiter l'hétérosis et c'est aussi un des exemples les plus étudiés d'interactions nucléo-cytoplasmiques chez les Plantes Supérieures.

Chez la fève, *Vicia faba* L., on a rencontré ce phénomène (BOND, 1957) mais il présente un certain nombre de particularités. Notamment le cytoplasme mâle-stérile est dit "instable". En effet, dans la descendance du croisement d'une lignée mâle stérile cytoplasmique par une lignée mâle mainteneuse de stérilité (sans gène de restauration de la fertilité), descendance attendue entièrement mâle-stérile, on trouve des plantes mâle-fertiles et des plantes présentant à la fois des secteurs mâle-stériles et des secteurs mâle-fertiles. Le pollen de ces plantes ou de ces secteurs mâle-fertiles, apporté sur une lignée mâle-stérile, se comporte comme celui d'une lignée mainteneuse de stérilité. Ceci suggère une modification du cytoplasme de l'état stérile à l'état fertile.

Nous avons choisi d'aborder ce phénomène par une étude phénotypique et génétique réalisée à partir d'une lignée homozygote fixée : le neuvième rétrocroisement d'une lignée mainteneuse sur la lignée possédant le cytoplasme mâle-stérile, c'est-à-dire de travailler à

génôme nucléaire supposé constant.

Nous avons défini dans un premier temps trois phénotypes floraux : S pour mâle-stérile (étamines gris-brun sèches sans pollen), F pour mâle-fertile (abondant pollen blanc) et I pour intermédiaire (toute observation n'entrant dans aucune des deux catégories précédentes). Les observations sont faites sur chaque tige de chaque plante tout au long de la période de floraison. Les plantes sont cultivées en serre.

Avec cette méthode, une lignée mâle-stérile cytoplasmique présente une large hétérogénéité phénotypique. Outre des plantes homogènes S, I ou F, on rencontre des plantes SVI ou IVF présentant une modification phénotypique de S vers I ou de I vers F, simultanément sur les différentes tiges, chaque plante de ce type indépendamment. On trouve également des plantes qui présentent simultanément différents phénotypes sur leurs différentes tiges (plantes X).

Ces modifications phénotypiques reflètent des modifications du matériel héréditaire. En effet les plantes S, I et F fournissent en descendance maternelle des proportions différentes des différents phénotypes. Il en est de même des secteurs S et I des plantes SVI.

Nous avons pu vérifier l'absence d' "effet pollen" et donc à la fois l'absence de gènes de restauration dans notre matériel et le caractère strictement maternel de l'hérédité de ces phénotypes floraux.

Les proportions de plantes de différents phénotypes dans une descendance dépendent du phénotype de la plante mère mais aussi du phénotype de la plante grand-mère. Cet "effet grand-mère" a été vérifié sur plusieurs générations.

Avec la disparition des plantes homogènes S après trois générations en serre, nous nous sommes attachés à l'analyse des phénotypes intermédiaires. On peut distinguer aisément deux phénotypes floraux "intermédiaires" : "I classique" avec peu de pollen et des étamines gris-brun et "Sn" avec des étamines noires sans pollen, mâle-stérile différent de S et jusqu'alors toujours associé dans la même fleur ou dans le même groupe de fleurs au phénotype I classique. On peut distinguer ainsi les plantes "I classiques" des plantes "SnI", ces dernières présentant fréquemment des fleurs ou des étamines Sn. Cette hétérogénéité phénotypique à l'intérieur de la classe I se vérifie au niveau des descendances.Ainsi on rencontre des plantes homogènes Sn, et ce uniquement dans la descendance des plantes SnI.

Ces différents phénotypes Sn, SnI et Ic s'héritent maternellement, les plantes soeurs de phénotypes différents fournissant différentes proportions de plantes Sn, SnI et Ic. Dans tous les cas ils sont "instables" et fournissent également des descendants F, mâle-fertiles.

S'il s'est avéré impossible d'aboutir par sélection maternelle à un cytoplasme mâle-stérile stable à partir du phénotype S, la sélection apparait plus efficace sur les phénotypes I. La proportion de plantes F diminue quand celle des plantes I s'accroit au cours des générations.

Nous avions proposé comme hypothèse de travail que ce cytoplasme mâle-stérile instable était génétiquement hétérogène. Un modèle simple où coexistent deux catégories de déterminants cytoplasmiques en proportions relatives variables ne permet pas de rendre compte des résultats. L'ensemble des données recueillies sur cinq générations ne peut s'interpréter que par l'intervention d'au moins quatre catégories de déterminants cytoplasmiques génétiquement distincts. Les phénotypes floraux observés résultent des divers "états cytoplasmiques" possibles.

L'hypothèse est discutée à la lumière des travaux récents portant sur la génétique cytoplasmique de divers organismes et particulièrement des Végétaux Supérieurs.